

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 30 October 2000 (30.10.00)	Applicant's or agent's file reference 661450
International application No. PCT/JP00/01494	Priority date (day/month/year) 18 March 1999 (18.03.99)
International filing date (day/month/year) 13 March 2000 (13.03.00)	
Applicant SUGIYAMA, Atsushi	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
 24 August 2000 (24.08.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer R. Forax Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	---

PCT

国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類7 C12Q 1/06, 1/34, 1/42, 1/48	A1	(11) 国際公開番号 WO00/55356 (43) 国際公開日 2000年9月21日(21.09.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/01494 (22) 国際出願日 2000年3月13日(13.03.00) (30) 優先権データ 特願平11/73690 1999年3月18日(18.03.99) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 扶桑薬品工業株式会社 (FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.)[JP/JP] 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号 Osaka, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 杉山 篤(SUGIYAMA, Atsushi)[JP/JP] 〒406-0023 山梨県東八代郡石和町八田73-5 Yamanashi, (JP) (74) 代理人 青山 葆, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)		(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: ENZYMATIC FLUORIMETRIC ASSAY OF cAMP AND ADENYLATE CYCLASE (54)発明の名称 cAMPおよびアデニル酸シクラーゼの酵素的蛍光定量アッセイ (57) Abstract A method for quickly assaying the cAMP content or the adenylate cyclase activity in a biological sample containing endogenous non-cyclic adenine nucleotides without resort to any radioactive reagents. More particularly, a method for assaying the cAMP content or the adenylate cyclase activity in a biological sample containing endogenous non-cyclic adenine nucleotides selected from the group consisting of cAMP formed by endogenous adenylate cyclase, ATP, AMP, ADP and mixtures thereof which comprises: (1) adding efficacious amounts of apyrase, adenosine deaminase and alkaline phosphatase to the above sample to thereby enzymatically remove the endogenous non-cyclic adenine nucleotides other than cAMP and glyucose-6-phosphate therefrom; (2) enzymatically converting cAMP into AMP; and (3) thus quantitating AMP without resort to any radioactive substances; and a kit for performing this method.		

本発明は内因性の非環状アデニンヌクレオチド類を含む生物学的試料中の c AMP 量またはアデニル酸シクラーゼ活性を、放射性試薬を使用することなく迅速に測定する方法に関する。具体的には、内因性アデニル酸シクラーゼによって生成される c AMP と、ATP、AMP、ADP およびこれらの混合物からなる群から選択される内因性の非環状アデニンヌクレオチド類を含む生物学的試料中の c AMP 量またはアデニル酸シクラーゼ活性の測定方法であって、(1) 上記試料中の c AMP 以外の内因性非環状アデニンヌクレオチドおよびグルコース-6-リン酸を酵素的に除去するためにアピラーゼ、アデノシンデアミナーゼおよびアルカリフォスファターゼの有効量を混合し、(2) c AMP を AMP に酵素的に変換し、(3) 放射性物質を用いることなく AMP の量を測定することを特徴とする方法、およびこの方法を実施するためのキットを提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AG アンティグア・バーブーダ	DZ アルジェリア	LC セントルシア	SD スーダン
AL アルバニア	EE エストニア	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AM アルメニア	ES スペイン	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AT オーストリア	FI フィンランド	LR リベリア	SI スロヴェニア
AU オーストラリア	FR フランス	LT レット	SK スロヴァキア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LV ラトヴィア	SL シェラ・レオネ
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LU ルクセンブルグ	SN セネガル
BB バルバドス	GD グレナダ	LV ラトヴィア	SZ スワジランド
BE ベルギー	GE グルジア	MA モロッコ	TD チャード
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MC モナコ	TG トーゴ
BG ブルガリア	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TJ タジキスタン
BJ ベナン	GN ギニア	MG マダガスカル	TM トルクメニスタン
BR ブラジル	GR ギリシャ	MK マケドニア	TR トルコ
BY ベラルーシ	GW ギニア・ビサウ	共和国	TT トリニダード・トバゴ
CA カナダ	HR クロアチア	ML マリ	TZ タンザニア
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	MN モンゴル	UA ウクライナ
CG コンゴ	ID インドネシア	MR モーリタニア	UG ウガンダ
CH スイス	IE アイルランド	MW マラウイ	US 米国
CI コートジボアール	IL イスラエル	MX メキシコ	UZ ウズベキスタン
CM カメルーン	IN インド	MZ モザンビーク	VN ヴェトナム
CN 中国	IS アイスランド	NE ニジェール	YU ユーゴスラヴィア
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NL オランダ	ZA 南アフリカ共和国
CU キューバ	JP 日本	NO ノーウェー	ZW ジンバブエ
CY キプロス	KE ケニア	NZ ニュー・ジーランド	
CZ チェコ	KG キルギスタン	PL ポーランド	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	PT ポルトガル	
DK デンマーク	KR 韓国	RO ルーマニア	

明 細 書

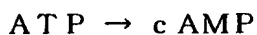
c AMPおよびアデニル酸シクラーゼの酵素的蛍光定量アッセイ

5 技術分野

本発明は、ATPから内因性アデニル酸シクラーゼによって生成されるc AMP (サイクリックアデノシン3', 5'-リン酸)と、ATP (アデノシン-三リン酸)、AMP (アデノシン-リン酸)、ADP (アデノシン-二リン酸)およびこれらの混合物からなる群から選択される内因性の非環状アデニンヌクレオチド類を含む生物学的試料中のc AMP量またはアデニル酸シクラーゼ活性を、放射性試薬を使用しないで測定する方法を提供するものであり、要約すれば、(1)上記試料中のc AMP以外の内因性非環状アデニンヌクレオチドおよびグルコース-6-リン酸を酵素的に除去するためにアピラーゼ、アデノシンデアミナーゼおよびアルカリフォスファターゼの有効量を混合し、(2)c AMPをAMPに酵素的に変換し、(3)放射性物質を用いることなくAMPの量を測定することを特徴とする方法に関する。

背景技術

アデニル酸シクラーゼ(アデニルシクラーゼ、アデニルシクラーゼ、EC 4.6.1.1)は、 Mg^{2+} または Mn^{2+} の存在下で



を触媒する酵素である。

アデニル酸シクラーゼは細胞膜に局在しており、種々の基本的なホルモンおよび神経伝達物質のシグナル形質導入カスケードとして重要な役割を果たしている。

例えば、アデニル酸シクラーゼ活性を測定することにより、ヒトの心臓移植や鬱血性心疾患時に現れる生理学的変化を理解することができる [M. R. Bristow et al., New Engl. J. Med., 第307巻, 205頁(1982年); K. G. Lurie et al., J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 第86巻, 195頁(1983年)]。

このアデニル酸シクラーゼ活性は、アデニル酸シクラーゼの触媒作用によりA

TPから合成されるcAMP量の変化を測定することによって求めることができる。

しかし、アデニル酸シクラーゼの生物学的役割のより明確な解明はcAMPの組織レベルでの変化をモニターすることが困難であるため制限されている。

- 5 cAMP(サイクリックアデノシン3',5'-リン酸)は1957年、肝臓においてアドレナリンおよびグルカゴンの血糖上昇作用を仲介する因子として見出され[E. W. Sutherland et al., J. Am. Chem. Soc., 第79巻, 3608頁(1957年)]、その後、副腎皮質ホルモン(ACTH)、黄体形成ホルモン(LH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、副甲状腺刺激ホルモン(PTH)などの種々のホルモンやプロスタグランジンなどの生理活性物質もcAMPを介して作用が発揮されることが明らかとなった。すなわち、cAMPは、ペプチドホルモンや活性アミンが分泌されて目標の細胞に到達した際、それらが細胞内で酵素反応を進めるための情報伝達を担い、いわゆるセカンドメッセンジャーとしての機能を有している。
- 10

- cAMPは生体内では膜に局在するアデニル酸シクラーゼによってATPから合成され、ホスホジエステラーゼによって5'-AMPに分解される。細菌や動物界に広く存在するが、非常に微量である(定常濃度0.1~1nモル/湿重量)。cAMPの定量法としては、cAMP結合タンパク質を用いる方法または放射免疫法が簡便である。cAMP含量は細胞の栄養、増殖、分化、適応状態に左右され敏感に変動する。
- 15

- 20 多種多様な哺乳動物および非哺乳動物の組織や体液中のcAMPを測定することは、細胞生存度、内分泌ホルモン軸機能、アデニル酸シクラーゼ活性およびホスホジエステラーゼ活性を評価するための有用な方法と成り得る。さらに、cAMP測定を利用して、シグナル形質導入、リボソームタンパク質合成、発生期タンパク質の転位および他の主要な細胞機能で重要な役割を果たしているGタンパク質(グアニンヌクレオチド結合タンパク質)ファミリーをはじめとする、多数のシグナル形質導入タンパク質の活性を評価することができる[Bourne et al., Nature, 第348巻, 125頁(1990年)]。
- 25

 また、cAMPの測定は、特定の細胞、組織、器官または体液中の環状ヌクレオチドの値を変動させる可能性のある他の内因性及び外来性化合物(例えば、一

酸化二窒素)の評価に使用することができる。

生物中の主要な調節ホルモン/タンパク質である、エピネフリン、ノルエピネフリン、アドレノコルチコトロピン(ACTH)、バソプレシン、グルカゴン、チロキシン並びに甲状腺刺激及びメラノサイト刺激ホルモンをはじめとする多数のホルモンは、セカンドメッセンジャーとしてcAMPを使用する。これら全てのホルモンおよび調節物質の活性は、本発明の測定方法を適用して組織、血清、体液および全ての細胞培養物(細胞及び培地)中で測定することができる。これらホルモンの測定は、ホルモン不均衡から特定の病状となる可能性のある多種多様な疾病状態について実施することができる。

ホルモンまたは調節タンパク質が特定のレセプターと相互作用すると、セカンドメッセンジャー(cAMP)が、カスケードとして生成される。cAMPの生成は場合によっては、特定のホルモンシグナル形質導入経路の一部としてcAMPの減少を使用するホルモンによって特異的に抑制することもできる。この調節タンパク質またはホルモンとレセプターの相互作用の結果は、(1)例えば、イオンチャンネルの変化による細胞透過性の変動、(2)cAMP濃度に敏感な酵素触媒反応速度の変動、(3)他の酵素の合成および分解を含むタンパク質合成速度の変動が考えられる。cAMPの測定は、ホルモンまたは調節タンパク質がレセプターと相互作用した後に、これらの結果を直接および間接的に測定するために使用することができる。

具体的には、cAMPの測定は、試料中のcAMPの分解を防止することによってアドレナリン作動性神経系を刺激するアミノフィリンまたはテオフィリンのような医薬品レベルのマーカーとして使用することができる。細胞培養物中のcAMPの測定を使用して特定のホルモン、調節タンパク質および医薬品を評価することができ、その際cAMPはシグナル形質導入過程での生体結合を示す。

cAMP測定はまた、特定のホルモンまたは調節タンパク質の不存在下あるいは存在下で細胞を試験することによって、細胞の生存度および安定性を評価するために使用することもできる。例えば、グルカゴンによる肝臓細胞(肝細胞)中のcAMPを測定することにより、肝細胞の生存度を評価することができる。これは、例えば、器官および/または細胞の移植、例えば心臓、肝臓、肺、腎臓、脾

臓、皮膚および脳の細胞移植に有用である。

細胞内 c AMP 値を高めるかまたは低下させる多種多様なホルモン、調節タンパク質および医薬品で活性化した後の生検試料から得られる細胞の応答性の測定は、細胞機能を詳細に評価する方法として使用することができる。

- 5 特殊な臨床例としては、心筋層の応答を評価するために心臓生検で c AMP を測定することが挙げられる。心筋症の心臓細胞は、 β -アドレナリン作動性刺激後の c AMP 含有量が上昇しても応答しない。心疾患の重篤度および幾つかの医薬品、例えば β -アドレナリン作動性遮断剤およびアンギオテンシン変換酵素インヒビターの有効性の診断は、正常な心臓と心筋症心臓から得られる生検試料の
- 10 応答性を比較することによって行うことができる。循環血液細胞中の基底状態または刺激状態でのアデニル酸シクラーゼ活性または c AMP の測定は患者の治療の指針に用いることができる。更に、細胞内または動脈若しくは静脈循環内への c AMP 放出は、虚血、低酸素症または医薬品若しくはホルモン刺激のような種々の異なる生理学的および非生理学的ストレスに対する器官および／または組
- 15 織の応答のインディケーターとして使用することができる。組織若しくは体液中の c AMP 値は、この方法を用いて血球および血小板を含む殆ど全ての哺乳動物細胞または体液中で測定することができる。幾つかの組織では、潜在的腫瘍細胞試料の場合に、腫瘍原性および／または侵入性に対する指標として特異的な刺激剤に応答する c AMP 値を測定することができる。他の場合には、c AMP 合成
- 20 または分解を変える可能性のある特異的な治療法の有効性を決定するために c AMP の測定を使用することができる。

- 上記のように、c AMP はセカンドメッセンジャーとして細胞内情報伝達において、重要な役割を果たしていると同時に、様々な生理的機能を有していることから、アデニル酸シクラーゼの触媒作用により ATP から合成される c AMP 量
- 25 を測定し、さらにアデニル酸シクラーゼ活性を求めたり、c AMP の挙動を解明することは、基礎医学研究分野のみならず、臨床医学の分野においても非常に意義深いことといえる。

アデニル酸シクラーゼ活性の測定は、ATP を基質として生成した c AMP を定量することによって行う。c AMP の定量は、(1) 標識された ATP を基質と

する方法と(2)非標識ATPを基質として用いる方法に区別することができる。

(1)の標識されたATPを基質とする方法では、放射性同位元素で標識されたATP(例えば $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP)を基質とし、アデニル酸シクラーゼの作用により合成された放射性標識cAMP($[\text{}^{32}\text{P}]$ cAMP)をATPから分離し、
5 その放射活性を測定する[Y. Salomon et al., Anal. Biochem., 第58巻, 541頁(1974年); R. A. Johnson et al., In Method in Enzymology, 第195巻, 3頁(1991年)]。この方法においては、イオン交換樹脂および酸化アルミニウムカラムを用いた連続アフィニティクロマトグラフィーを用いて $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPと $[\text{}^{32}\text{P}]$ cAMPを分離している。

10 しかし、上記(1)の定量法は高感度である反面、高価で危険性の高い放射性標識化合物を使用しなければならない。

一方、(2)の非標識ATPを基質として用いる方法は、①非標識ATPから生成したcAMPを放射性物質で標識したcAMPと競合的に対応する抗血清に対して抗原抗体反応させ、結合抗体の放射活性を測定してcAMPを定量する、いわゆるラジオイムノアッセイと、②cAMP依存性プロテインキナーゼとcAMP
15 の特異的結合を利用し、cAMP依存性プロテインキナーゼと結合した ^3H -cAMPの放射能を測定する、プロテインバインディングアッセイ[A. G. Gilman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第67巻, 305頁(1970年)]に分類することができる。

20 この(2)の非標識ATP基質を用いる方法は、環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼによるcAMPの分解を補正できないため、ホスホジエステラーゼ活性の強い検体には不適當である。

さらに、安全性及び環境に与える影響を考慮すれば、このような放射性物質の使用は極力避けるべきである。従って、アデニル酸シクラーゼ活性およびその指標となるcAMPの定量のため高感度の非放射性定量法の開発が望まれていた。
25

しかしながら、大部分の哺乳動物の組織中において、cAMPの濃度は非常に低いため、放射性物質を用いなくて測定することは容易ではない。また、AMPやADP、ATPなどの試料中の非環状アデニンヌクレオチド類が、cAMPの数百倍から数十万倍以上の濃度で共存しており、しかも化学構造が類似している

ことから、妨害物質として作用し、c AMPの定量を一層困難なものとしている。特にATPはc AMPの1億倍の濃度で存在していることもあり、このような内因性のATPを完全に除去しない限り、正確なc AMPの測定は実質的に不可能であった。

5 一方、c AMPはホスホジエステラーゼの作用によりAMPに変換されるが、AMPの測定については、放射性物質を用いない方法が開示されている。Lowryらは、還元型ピリジヌクレオチドの蛍光を用いた高感度定量法 [O. H. Lowry et al., A Flexible System of Enzymatic Analysis, Harcourt Brace Jovanovich, New York (1972年); F. M. Matschinsky et al., J. Histochem. Cytochem., 第16巻, 29頁 (1968年)] を開示している。これは、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADPH)の340nmにおける吸光度が0.1mmolあたり0.617を示すことを利用し、試料の吸光度値からNADPHの絶対濃度を求める方法である。

10 また、グリコーゲンをグルコース-1-リン酸に変換する酵素であるグリコーゲンホスホリラーゼが無機リン酸(P_i)の存在下でAMPにより活性化されることを利用したAMPの測定も提案されている [E. Helmreich et al., Biochemistry, 第52巻, 647頁 (1964年); 同上, 第51巻, 131頁 (1964年); M. Trus et al., Diabetes, 第29巻, 1頁 (1980年)]。この方法では、グリコーゲンがグルコース-1-リン酸に変換される量からグリコーゲンホスホリラーゼ活性を求め、この活性を指標として、AMPの量を測定することができる。さらに、AMPを高感度
20 に測定する方法は、Lurie等によって開発されている [K. Lurie et al., Ann. J. Physiol., 第253巻, H662頁 (1987年)]。

c AMPやアデニル酸シクラーゼの分析感度や特異性を高めるために、試料中の非環状アデニンヌクレオチド類を酵素分解および/またはクロマトグラフィーにより除去する方法も知られている [N. D. Goldberg et al., Anal. Biochem., 第28巻, 523頁 (1969年); B. McL. Breckenridge, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 第52巻, 1580頁 (1964年)]。

しかしながら、これらの先行技術においては、妨害物質である内因性のADPやATPを完全には除去できないためc AMPの測定は不可能であると結論されていた。それゆえ、放射性物質を使用することなく、生物学的試料中のc AMP

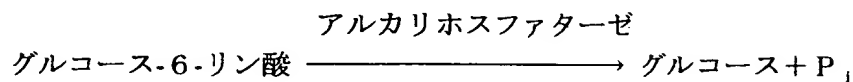
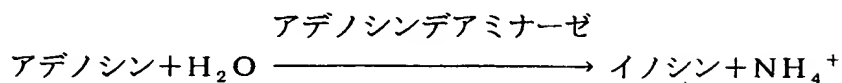
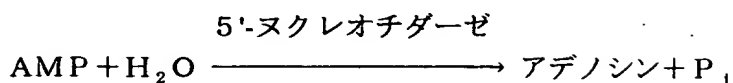
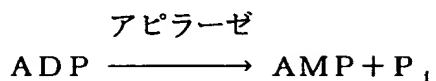
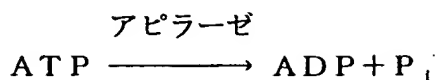
量およびそれに基づくアデニル酸シクラーゼ活性を高感度に求める手段は実質的にはなかったことになる。

本発明者は、先に、全く新しい観点からアデニル酸シクラーゼ活性の測定およびcAMP量の定量方法の開発を試み、鋭意検討した結果、妨害物質であるATPやADP、AMPなどの試料中の内因性非環状アデニンヌクレオチド類やグルコース-6-リン酸を酵素を用いて選択的に除去した後、試料中のcAMPをAMPに酵素的に変換し、さらにAMPをATPに変換し、そして、フルクトース-6-リン酸を経由してグルコース-6-リン酸に変換した後、NADPHに変換し、このNADPH濃度を蛍光光度法で測定し、cAMP濃度と相関させることにより、有害な放射性物質を用いることなく、酵素反応・化学反応のみで、cAMP量およびそれに対応するアデニル酸シクラーゼ活性を測定することに成功した(WO 94/17198)。

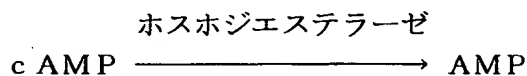
そして、この方法を用いることで、 μg オーダーの生物学的試料中のcAMP量をpmolまたはfmolレベルで正確に定量することが可能となった[A. Sugiyama et al., Anal. Biochem., 第218巻, 20頁(1994年); A. Sugiyama et al., J. Clin. Lab., 第8巻, 437頁(1994年); A. Sugiyama et al., Anal. Biochem., 第225巻, 368頁(1995年); A. Sugiyama et al., Yamanashi Med. J., 第10巻, 11頁(1995年)参照]。

上記従来方法の反応式を以下に示す。

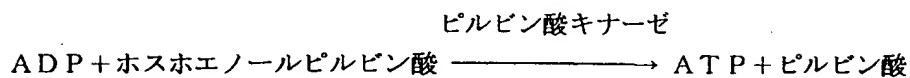
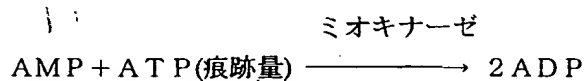
工程1：クリーニング反応(試料中の内因性非環状ヌクレオチド類および内因性グルコース-6-リン酸の除去)



工程2：変換反応1 (c AMPからAMPへの変換)



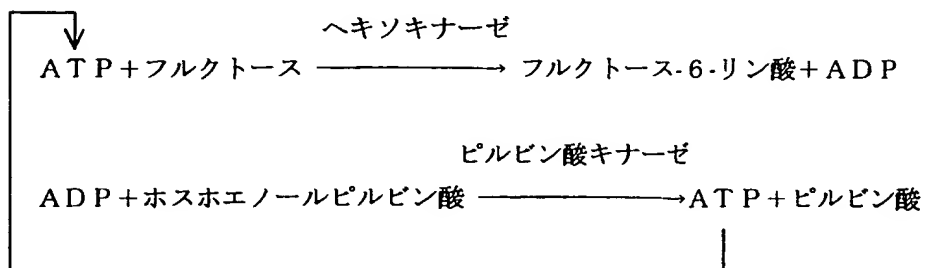
工程3：変換反応2 (AMPからATPへの変換)



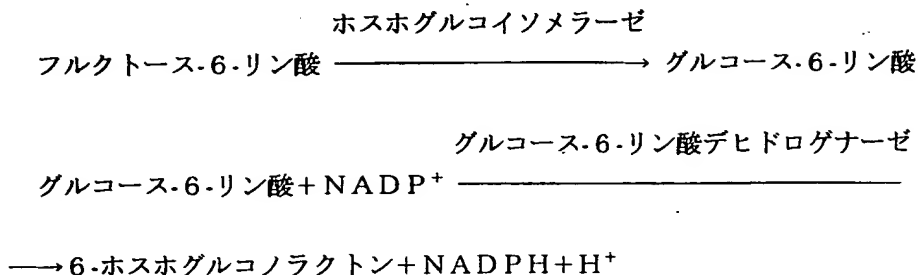
5

工程4：ATP-ADPサイクル反応による増幅

(測定感度を6000～1万倍に増幅する)



工程 5 : 検出反応 (NADPH の蛍光光度測定)



発明の開示

- 5 上記の従来技術の方法は、原理的に非常に優れた c AMP の定量手段であり、かつ、理論的にも正確なものであるが、クリーニング反応に要する時間が長い、サイクル反応後に加熱による酵素を失活させる際に、反応混合物の白濁が生じる、などの点で改良の余地があった。

10 本発明は、より簡便で、迅速な c AMP 量やアデニル酸シクラーゼ活性の測定手段であって、しかも放射性物質を使用しない測定方法の開発を目指して鋭意研究した結果完成されたものである。

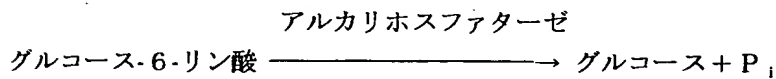
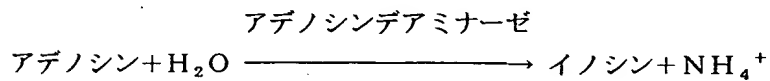
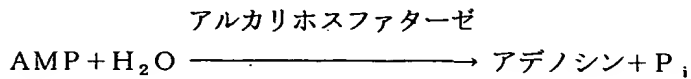
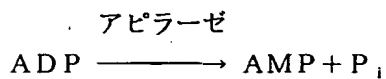
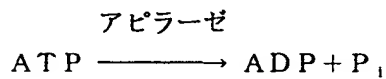
本発明は、先に本発明者らが開示した酵素反応および蛍光光度法を採用したアデニル酸シクラーゼ活性測定法および c AMP 定量法 (WO 94/17198) の改善を図ったものである。即ち、(1) クリーニング反応において、5'-ヌクレオチダーゼの使用を取りやめることにより、反応時間を 1 時間から 5 分乃至 10 分間と劇的に短縮することに成功し、(2) サイクル反応において、反応後の酵素の失活方法を加熱に代えて、EDTA などのキレート剤を用いて試料中の Mg^{2+} をキレート処理して除去し、酵素を失活させることにより、試料の白濁を防止した。これにより、続いて行う検出反応の精度が向上した。また、(3) 従来 2 段階であった変換反応を 1 段階とすることで、より簡便な操作を可能とした。そして、(4) 検出反応において試薬等の濃度を再検討し、最適化した。これらの改良を加えることによって、生物学的試料中の c AMP 量およびそれに対応するアデニル酸シクラーゼ活性をより迅速、且つ高感度に測定できる酵素的蛍光定量アッセイまたは分光光度アッセイを提供することが可能となった。

25 なお、本発明は後述するように、グアニン調節タンパク質および c AMP 特異

的ホスホジエステラーゼの活性を測定するために使用することもできる。

本発明の c AMP の測定に用いられる反応を以下に記載する。

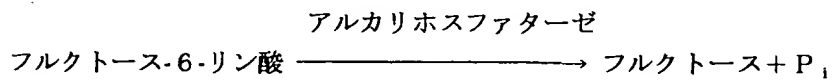
ステップ 1 - クリーニング反応 (試料中の内因性非環状アデニンヌクレオチド類およびグルコース-6-リン酸の除去)



5

ステップ 1 - クリーニングオプション反応 1

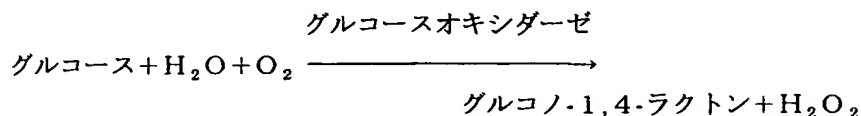
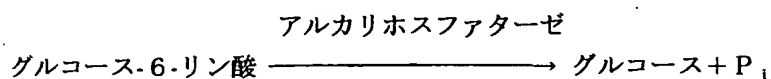
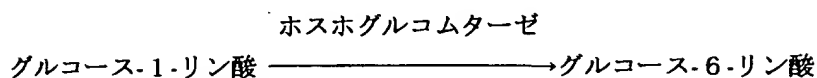
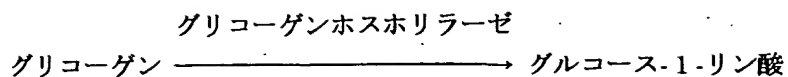
(フルクトース-6-リン酸の除去)



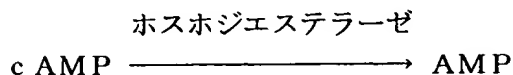
ステップ 1 - クリーニングオプション反応 2

(試料中の内因性グリコーゲンの除去)

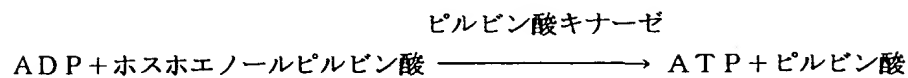
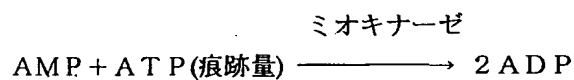
10



ステップ2-変換反応(AMP化反応)

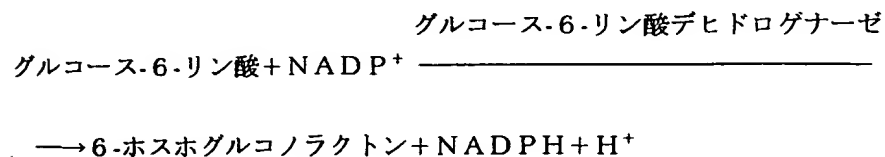
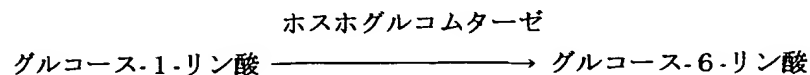
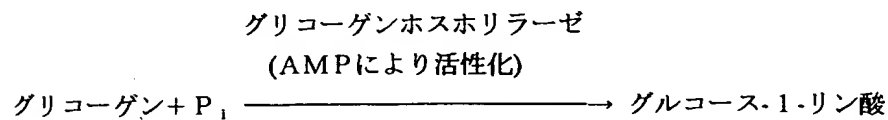


ステップ2-変換オプション反応1(ATP化反応)

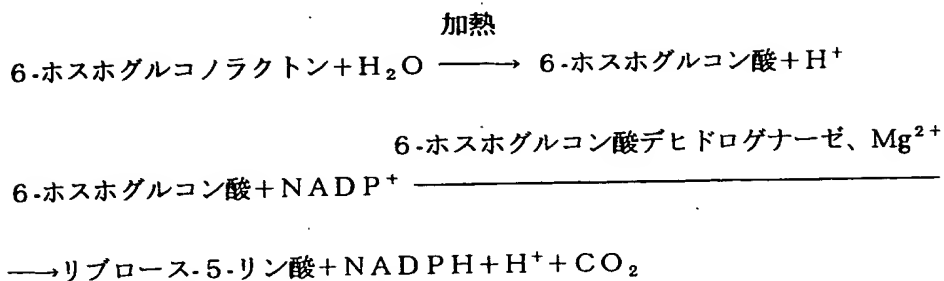


5

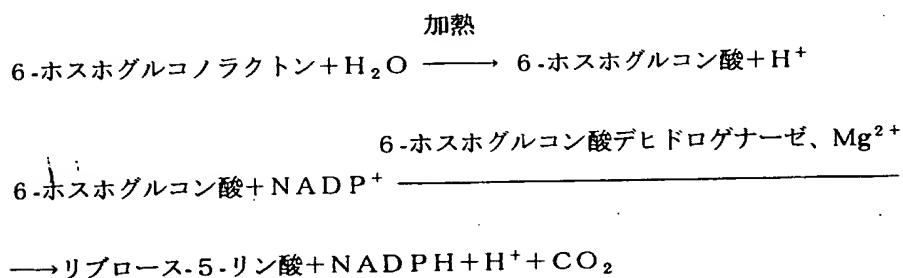
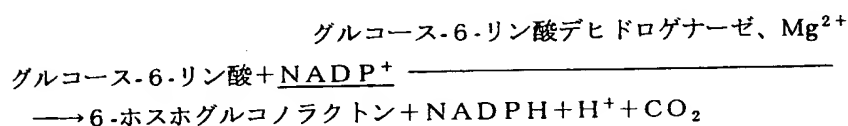
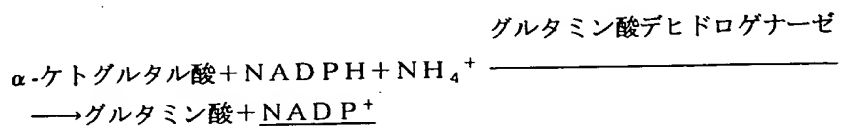
ステップ3-検出反応1(NADPHの蛍光光度測定)



ステップ3－検出オプション反応1 (6-ホスホグルコノラク톤の分解)

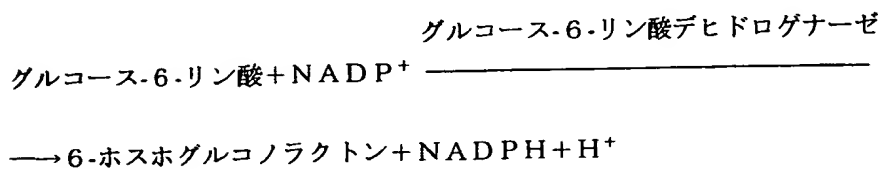
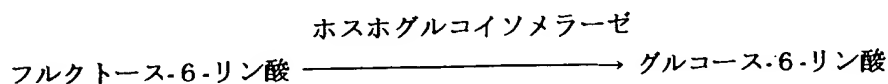
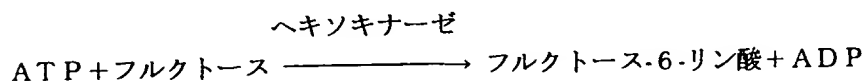


ステップ3－検出サイクル反応1

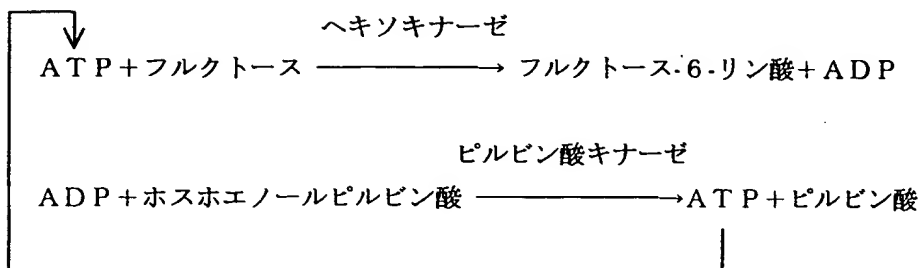


5

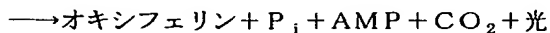
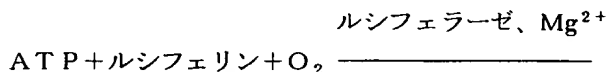
ステップ3－検出反応2 (NADPHの蛍光光度測定)



ステップ3－検出サイクル反応2 (ATP-ADPサイクル反応による増幅
(測定感度を6000～1万倍に増幅する))



ステップ3－検出反応3 (ATPの検出) (ルシフェラーゼ反応)



上記の反応をさらに詳細に説明する。

ステップ1－クリーニング反応 (試料中の内因性非環状アデニンヌクレオチド類およびグルコース-6-リン酸の除去)

本発明は、アピラーゼ、アデノシンデアミナーゼおよびアルカリホスファターゼの混合物により、試料中のcAMP以外の内因性非環状アデニン残基を有する化合物(アデノシン、ATP、ADPおよびAMP)を酵素的に除去する工程を含む。そして、好ましくは、アルカリホスファターゼを用いて試料中のグルコース-6-リン酸をグルコースへ酵素的に変換する工程を含む(クリーニング反応)。

本発明のクリーニング反応は、cAMPより遙かに高濃度であり、除去しなければ実質的にブランクを高めるおそれのある全ての試料中の内因性ATP、ADPおよびAMPを除去することができる。グルコース-6-リン酸は後に検出反応で生成するので、試料中のグルコース-6-リン酸をあらかじめ酵素的に除去しておくことは、本測定方法の精度を向上させるので好ましい。これらのクリーニング反応は、検出感度の向上のために重要である。

しかも本発明では、従来クリーニング反応に用いられていた4種類の酵素(ア

ピラーゼ、5'-ヌクレオチダーゼ、アルカリホスファターゼおよびアデノシンデアミナーゼ)のうち、5'-ヌクレオチダーゼの使用を取りやめることにより、反応時間が著しく短縮され、簡略化した。すなわち、約1時間を要していた反応時間が僅か5分乃至10分間程度に著しく短縮できることを見出した。

5 ステップ1-クリーニングオプション反応1

(フルクトース-6-リン酸の除去)

また、同様にサイクル反応および検出反応で生成するフルクトース-6-リン酸もアルカリホスファターゼで加水分解し、除去しておくのが好ましい。

ステップ1-クリーニングオプション反応2

10 (試料中の内因性グリコーゲンの除去)

さらに好ましくは、グルコースオキシダーゼ、グリコーゲンホスホリラーゼおよびアルカリホスファターゼを用いて、グルコース-6-リン酸に変換される試料中の内因性グリコーゲンを除去する(オプション反応)。これにより、ステップ3-検出反応1(NADPHの蛍光光度測定)において既知量のグリコーゲンを添加する際の妨害物質となる内因性グリコーゲンが消失する。

ステップ2-変換反応(AMP化)

次に、クリーニング反応後の試料にホスホジェステラーゼを作用させ、cAMPをAMPに変換する(変換反応)。

ステップ3-検出反応1(NADPHの蛍光光度測定)

20 上記変換反応後、グリコーゲンおよび無機リン酸を添加し、AMPがグリコーゲンホスホリラーゼを活性化してグリコーゲンからグルコース-1-リン酸を生成する程度を指標として、AMPを定量する。即ち、グルコース-1-リン酸は、ホスホグルコムターゼによりグルコース-6-リン酸に変換され、グルコース-6-リン酸は最終的に6-ホスホグルコノラクトン、NADPH及びH⁺に酵素的に変換される。最後に、NADPH濃度を例えばTrusらの方法 [M. Trus et al., Diabetes, 第29巻, 1頁(1980年)] に従い、蛍光定量法を用いて測定する。

ステップ3-検出オプション反応1(6-ホスホグルコノラクトンの分解)

25 また、6-ホスホグルコノラクトンは、水性溶媒中、in vitroで加熱して6-ホスホグルコン酸に変換することができ、さらに6-ホスホグルコン酸は、NAD

P^+ の存在下でin vitroでNADPH、およびリブローズ-5-リン酸に変換することができる。これにより、NADPHの濃度を高めることができる。このNADPH濃度を上記と同様に例えばTrusらの方法 [M. Trus et al., Diabetes, 第29巻, 1頁(1980年)] に従い、蛍光定量法を用いて測定する。

- 5 ウサギ心臓から得られた同一試料に対する、刺激されたアデニル酸シクラーゼ活性を修正Salomon放射活性方法およびアルカリホスファターゼを用いない蛍光定量法の両方で測定したところ、測定結果は類似していた [Weign et al., Anal. Biochem., 第208巻, 217頁(1993年)]。放射活性測定法と蛍光定量法から得られた結果を比較すると、絶対的な比活性は異なっているが、アデニル酸シクラーゼ
- 10 の刺激倍率は類似している。比活性の差異は恐らくアデニル酸シクラーゼ反応混合物における些細なファクターによるものと思われる。即ち、放射活性測定では試料中ホスホジエステラーゼによる [^{32}P] cAMP分解を防ぐために非標識 cAMPが使用され、一方、蛍光定量法では、新たに合成される cAMPの試料中ホスホジエステラーゼによる分解を抑制するためにテオフィリンが使用されて
- 15 いる。

さらに、ステップ3-検出サイクル反応2で示したATP-ADPサイクル反応を使用したアデニル酸シクラーゼの測定によって、絶対的な比活性は放射活性および蛍光定量法の両方で同一であることが明らかになった。

- 本発明の方法は、各反応工程毎に使用する酵素や緩衝液等をバイアル等に封入
- 20 し、予めキットとして調製すれば、より簡便に実施することができる。

- 具体的には、(1)生物学的試料中の内因性ATP、ADPおよびAMPからなる非環状アデニンヌクレオチド類および内因性グルコース-6-リン酸を除去するのに効果的な量のアピラーゼ、アルカリホスファターゼおよびアデノシンデアミナーゼを含むクリーニング反应用バイアルキット、(2)生物学的試料中の cAMP
- 25 PをAMPに酵素的に変換するのに有効な量のホスホジエステラーゼを含む変換反应用バイアルキット、および(3) (a)グリコーゲンをグルコース-1-リン酸に変換するためのグリコーゲン、無機リン酸およびグリコーゲンホスホリラーゼ、 (b)グルコース-1-リン酸をグルコース-6-リン酸に変換するためのホスホグルコムターゼ、ならびに(c)グルコース-6-リン酸を6-ホスホグルコノラクトン

およびNADPHに変換するためのグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼおよびNADP⁺を含む検出反応用バイアルキットを含む、生物学的試料中のcAMP量またはアデニル酸シクラーゼ活性の測定用キットである。

また、(1)生物学的試料中のcAMP以外の内因性非環状アデニンヌクレオチド類、および内因性グルコース-6-リン酸を酵素的に除去するのに有効な量のアピラーゼ、アデノシンデアミナーゼおよびアルカリホスファターゼを含むクリーニング反応用バイアルキット、(2)生物学的試料中のcAMPからATPの酵素的変換のための有効量のホスホジエステラーゼ、ATP、ミオキナーゼ、ホスホエノールピルビン酸およびピルビン酸キナーゼを含む変換反応用バイアルキット、および(3)(a)ATPをフルクトース-6-リン酸に変換するためのフルクトースおよびヘキソキナーゼ、(b)フルクトース-6-リン酸を6-ホスホグルコノラクトンおよびNADPHに変換するためのホスホグルコイソメラーゼおよびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼおよびNADP⁺を含む検出反応用バイアルキットを含む、生物学的試料中のcAMP量またはアデニル酸シクラーゼ活性の測定用キットを挙げることができる。

本発明の方法は、0.1mg未満の極微量の試料中のcAMP量を測定することができ、そして1fmol未満のcAMP/試料を測定することができる。また、本発明においては、生物学的試料に既知量のATPを添加し、このATPを試料中のアデニル酸シクラーゼの作用でcAMPに変換させ、次にクリーニング反応により内因性のATPなどのアデニンヌクレオチド類を全て除去した後、変換したcAMP量を求めることによってアデニル酸シクラーゼ活性を算出することもできる。

クリーニング反応において、アデノシンから生成したアンモニウムイオンは一連のクリーニング反応を本質的に完了させ、試料中のヌクレオチド類が再形成するのを妨げる。これらの操作により、これまでの蛍光定量アッセイからは予期できない顕著な改善効果が得られる。[Weign et al., Anal.Biochem., 第208巻, 217頁(1993年)]。

図1 ATPの標準試料におけるインキュベーション時間に対する蛍光光度測定値を示すグラフである。

図2 cAMPの標準試料の濃度に対する吸光光度測定値を示すグラフである。

図3 本発明の方法、免疫比色法および放射免疫測定法を用いてcAMP値を比較測定した結果を示す棒グラフである。

図4 本発明の方法、放射免疫測定法およびSalomon法を用いてアデニル酸シクラーゼ活性を比較測定した結果を示す棒グラフである。

発明を実施するための最良の形態

本発明の方法に従って定量される生物学的試料は、好ましくは哺乳動物由来のものであり、これには組織、血球、骨が含まれ、さらに尿、血液、髄液などの生物学的流体が含まれる。これらの試料は、新鮮なものであるか、または冷凍保存されていてもよい [Lowry et al., A Flexible System of Enzymatic Analysis, Harcourt Brace Jovanovich, New York(1972年)]。

好ましい実施態様では本発明は次のような段階を含んでいる。

ステップ1—クリーニング反応(試料中の内因性非環状ヌクレオチド類
およびグルコース-6-リン酸の除去)

cAMP、グルコース-6-リン酸および少なくとも1種の非環状アデニンヌクレオチド類、即ちATP、ADP、AMPまたはこれらの混合物からなる群から選択されるものを含んでいる生物学的試料を、アピラーゼ、アデノシンデアミナーゼおよびアルカリホスファターゼの混合物を含む水性緩衝液と混合して、非環状アデニンヌクレオチド類(ATP、ADPおよび/またはAMP)およびグルコース-6-リン酸を酵素的に変換して除去する。

「より迅速に」とは、従来約一時間を要していたクリーニング反応が約5~10分以内に、すなわち、 $1/12 \sim 1/6$ 、少なくとも $1/6$ の反応時間に短縮されることをいう。

ステップ1—クリーニングオプション反応2

そして任意に、上記反応混合物をグルコースオキシダーゼ、グリコーゲンホスホリラーゼおよびアルカリホスファターゼと混合して全ての試料中のグリコーゲ

ンを分解、除去する。このとき c AMP は反応混合物中にそのまま保持される。これにより、ステップ 3-検出反応 1 (NADPH の蛍光光度測定) において既知量のグリコーゲンを添加する際の妨害物質となる内因性グリコーゲンが消失する。

5 ステップ 2-変換反応 (AMP 化反応)

上記反応混合物をホスホジエステラーゼと混合して試料中の c AMP を AMP に変換する。

 ステップ 3-検出反応 1 (NADPH の蛍光光度測定)

さらに、AMP をグリコーゲンおよび無機リン酸の存在下でグリコーゲンホスホ
10 リラーゼと接触させてグルコース-1-リン酸を上記反応混合物中で生成させ、上
記反応混合物中でホスホグルコムターゼと反応させ、グルコース-6-リン酸を生
成させる。ついで、6-ホスホグルコノラクトン、NADPH 及び H^+ に酵素的
に変換し、上記反応混合物中の NADPH 濃度を蛍光定量法で測定する。そして、
この NADPH の濃度が上記試料中のアデニル酸シクラーゼ活性、c AMP 量ま
15 たは AMP 濃度と相関する。

この c AMP の測定法は、c AMP の 3', 5'-ホスホジエステル結合の開裂によ
って生成する AMP が、グリコーゲンホスホリラーゼ活性を刺激するという原
理に基づいている。すなわち、c AMP およびアデニル酸シクラーゼ活性の量は
c AMP から生成した AMP がグリコーゲンホスホリラーゼを活性化し最終的に
20 得られた NADPH の吸光度に対応する。

NADPH の最終濃度と AMP 濃度の相関関係は、例えば検量線によって求めることができる (図 2 参照)。

好ましくは、上記ステップ 1-クリーニング反応後に、加熱してクリーニング
反応で使用した酵素を不活性化する。

25 また好ましくは、上記ステップ 1-クリーニング反応に続いて、ホスホジエ
ステラーゼ、グリコーゲンホスホリラーゼ、グルコース-1, 6-二リン酸、無機リ
ン酸、グリコーゲン、 $NADP^+$ 、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、ホ
スホグルコムターゼおよび Mg^{2+} からなる液を反応混合物に添加し、上記変換
反応および検出反応の工程を in vitro で連続的に実施する。

ステップ3－検出オプション反応1（6－ホスホグルコノラクトンの分解）

任意に、ステップ3－検出反応1の反応混合物を加熱して6－ホスホグルコノラクトンを順次6－ホスホグルコン酸に変換し、その後、 Mg^{2+} の存在下で $NADP^+$ および6－ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼと反応させ、上記で示されるように、リブローズ-5-リン酸、 $NADPH$ 、 H^+ および CO_2 として上記ステップ3検出反応で生成する $NADPH$ の濃度を高めることもできる。

ステップ3－検出サイクル反応1

ステップ3－検出反応1で生成する $NADPH$ の有効濃度は、これをサイクル反応系で使用するることによって数オーダー増加させることができる。即ち、 α -ケトグルタル酸の存在下で $NADPH$ は $NADP^+$ およびグルタミン酸に変換される。 $NADP^+$ は順次、添加されたグルコース-6-リン酸を6－ホスホグルコノラクトンおよび $NADPH$ に変換する。上記したように、6－ホスホグルコノラクトンは加水分解され(H_2O 、加熱)、6－ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼおよび Mg^{2+} の存在下でリブローズ-5-リン酸および $NADPH$ に変換することができる [Lowry et al., A Flexible System of Enzymatic Analysis, Harcourt Brace Jovanovich, ニューヨーク (1972年)]。

ステップ2－変換オプション反応1（ATP化）

あるいは、 $cAMP$ から生成する AMP は、痕跡量の ATP の存在下でミオキナーゼと混合することにより ADP に変換することができる。次に生成した ADP は2-ホスホエノールピルビン酸およびピルビン酸キナーゼで処理することにより、 ATP とピルビン酸に変換される。この反応により、1分子の AMP から1分子の ATP が生成する（ATP化反応）。

上記の $cAMP$ から AMP 、 ADP を経由して ATP へ至る、ステップ2－変換反応およびステップ2－変換オプション反応1は、1段階で行うことができる。

ステップ3－検出反応2（ $NADPH$ の蛍光光度測定）

さらに ATP は、まずフルクトースの存在下でヘキソキナーゼで処理されフルクトース-6-リン酸および ADP に変換される。生成したフルクトース-6-リン酸はホスホグルコイソメラーゼの作用によりグルコース-6-リン酸に変換され、最終的に6－ホスホグルコノラクトン、 $NADPH$ 及び H^+ に酵素的に変換され

る。そして、同様に、NADPH濃度をTrusらの方法 [M. Trus et al., Diabetes, 第29巻, 1頁(1980年)] に従い測定する。

ステップ3－検出オプション反応1

さらに同様に、6-ホスホグルコノラクトンを加水分解して6-ホスホグルコン酸に更に変換し、この6-ホスホグルコン酸をNADP⁺の存在下で、NADPH、H⁺、CO₂およびリブローズ-5-リン酸に変換してもよい。

ステップ3－検出サイクル反応2 (ATP－ADPサイクル反応による増幅)

そしてさらにATPは、ATP-ADPサイクル反応に供される。即ち、ATPは、まずフルクトースの存在下でヘキソキナーゼで処理されフルクトース-6-リン酸およびADPに変換される。次にこのADPは、ホスホエノールピルビン酸およびピルビン酸キナーゼの作用によりATPおよびピルビン酸となる。ここで生成したATPは再びフルクトース-6-リン酸およびADPに変換される。この反応が繰り返されることにより、最終的にフルクトース-6-リン酸が蓄積する。

サイクル反応終了時の酵素の不活性化のために、キレート剤を添加する。キレート剤はEDTAのようなポリアミノカルボン酸、クエン酸のようなオキシカルボン酸などが用いられる。好ましくは、EDTAである。

サイクル反応では、過剰のフルクトースおよびホスホエノールピルビン酸から得られるフルクトース-6-リン酸は、ホスホグルコースイソメラーゼによりグルコース-6-リン酸に変換される。このグルコース-6-リン酸をグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼおよびNADP⁺で処理することによって6-ホスホグルコノラクトンおよびNADPHに変換される。そして、NADPH濃度をTrusらの方法 [M. Trus et al., Diabetes, 第29巻, 1頁(1980年)] に従い、測定する (ステップ3－検出反応2参照)。

ステップ3－検出反応3

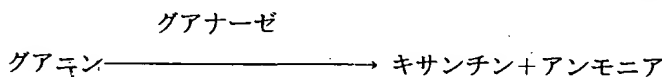
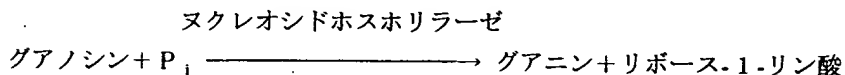
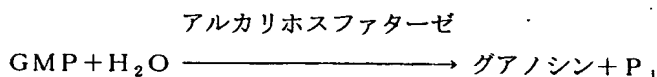
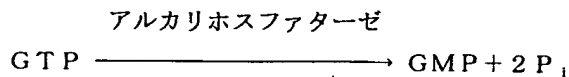
さらに、本発明においては、上記ステップ2－変換オプション反応1のATP化反応で生成したATPをルシフェラーゼ反応、すなわちホタルルシフェリンを使用する化学的蛍光分析法を用いて吸光度測定によって検出してもよい [Wulff et al., Methods of Enzymatic Analysis, H. U. Bergmeyer編集, VCH(1985年)]。ATPの測定値から、AMPおよびcAMP濃度ならびにそれに対応するアデニ

ル酸シクラーゼ活性を算出することができる。

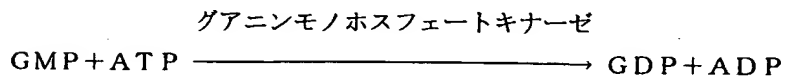
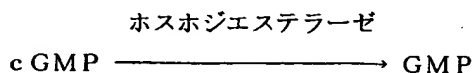
この反応の進行は非常に緩慢であるが、反応収率(発光した光子数と変換されたATP分子数の比率として定義される)はほぼ100%である。発光強度はATP濃度と正比例し、582nmで測定される。

- 5 本発明の測定法は、反応系の概念が同一であれば、AMP以外の物質に適用することができる。例えば、GMPに対応する酵素を適応することにより、グアニル酸シクラーゼ活性やサイクリックグアノシン-3', 5'-リン酸(cGMP)およびグアノシン-3', 5'-リン酸(GMP)の定量に用いることもできる。用いられる反応式を下記に示す。

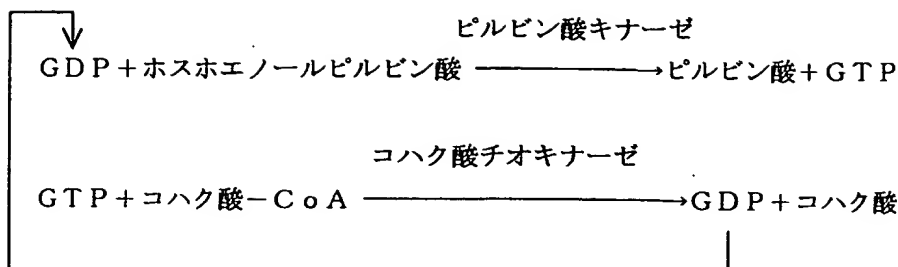
10 ステップ(i)-クリーニング反応



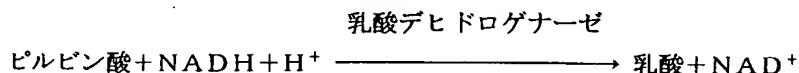
ステップ(ii)-変換反応



ステップ(iii)-サイクル反応



ステップ(iv)－検出反応



上記の反応をさらに具体的に説明する。

5 ステップ(i)－クリーニング反応

即ち、上記式に示したように、アルカリホスファターゼ、ヌクレオシドホスホリラーゼおよびグアナーゼからなるクリーニング混合物が使用される。アルカリホスファターゼは、c GMPの測定中にブランク値を高める可能性のある化合物、例えばグルコース-6-リン酸や非環状ヌクレオチドを脱リン酸化にも用いられ得る(クリーニング反応)。

10 クリーニング反応では、試料中GTPはGMP + 2 P_iに変換された後、グアノシンとP_iに変換される。グアノシンはグアニンとリボース-1-リン酸に変換され、そしてグアニンは、キサンチンとアンモニアに変換される。c AMPの測定におけるクリーニング反応と同様に、最終クリーニング反応におけるアンモニウム(またはNH₄⁺)は、一連のクリーニング反応を本質的に終了させ、その結果、干渉ヌクレオチドを確実に除去する。

好ましくは、クリーニング反応で使用する酵素は次のステップ(ii)－変換反応の前に、例えば加熱によって不活化される。

ステップ(ii)－変換反応

20 次に、ホスホジエステラーゼを用いて試料中に存在するc GMPをGMPに変

換する。GMPをグアニンモノホスフェートキナーゼの存在下でATPと混合するとグアノシン-5'-二リン酸(GDP)とADPが得られる。

ステップ(iii)－サイクル反応

GDPは、過剰のホスホエノールピルビン酸、スクシニル-CoAおよび無機リン酸(P_i)の存在下で一定量のピルビン酸を生じる(サイクル反応)。

ステップ(iv)－検出反応

このピルビン酸は、酸の存在下で乳酸および NAD^+ に変換される既知量のNADHを添加して間接的に定量される。かくして、インジケータ試料の蛍光は、cGMP、GMP又はグアニル酸シクラーゼについてアッセイされる試料中で生成するピルベートの量に正比例して減少する。また、過剰のNADHを酸で分解した後、変換された NAD^+ をアルカリを用いて、より蛍光強度の高い2-ヒドロキシニコチンアルデヒドに変換することによって測定感度を向上させることができる[K. Scya et al., Anal. Biochem., 第272巻、243頁(1999年)]。

本発明では、ステップ(ii)－変換反応において、グアニンモノホスフェートキナーゼによって分解するATP量を測定して、GMP量を求めることもできる。ATPは上記で示したような、公知の方法で測定することができる。

本発明の酵素的手法を用いたアデニル酸シクラーゼ活性またはグアニル酸シクラーゼ活性の測定は、高感度であり、費用も顕著に安く、また短時間で結果を得ることができる。さらに放射性物質を使用しないので、オペレーターにとって安全であり、そして環境に対しても良好である。

最後に、本発明の測定方法は、生物学的試料中内因性または外来性のホスホジエステラーゼの量を測定するように適合させることも容易である。即ち、cAMPの予め選択された単一量を未知濃度のホスホジエステラーゼを含有する試料に添加する。この時、ホスホジエステラーゼに対する特異的なインヒビターを必要に応じて添加してもよい。cAMPの予め選択された単一の過剰量を種々の予め選択された既知量のホスホジエステラーゼに添加することによって標準曲線が得られる。添加されたcAMPの幾らかがホスホジエステラーゼによってAMPに転換される反応時間(5～60分)後に、反応を停止させる。cAMP標準曲線を同時に実施して反応が適切に進行していることを証明することができる。クリーニ

ング反応を開始して、非環状アデニンヌクレオチドをすべて分解する。残存 c AMP は天然 + 添加ホスホジエステラーゼに反比例する。次に、c AMP を通常の方法で AMP に変換し、測定する。

具体的には、試料組織を SET 緩衝液 (0.5 M のシュークロース、0.03 M のトリス、2 mM の EDTA) に溶解し、2 倍量の PDE 混合物 (50 mM のトリス、50 μ M の c AMP) を添加し、37°C で 20 分間インキュベーションする。この反応混合物を 80°C で 30 分間加熱する。組織に対して 4 倍量のクリーニング反応混合物を添加し、37°C で 1 時間インキュベーションする。この反応混合物を 80°C で 30 分間加熱する。次に組織に対して 10 倍量の変換反応混合物を添加し、室温で 1 時間インキュベーションした後、検出反応により、NADPH の蛍光強度を測定する。

本発明においては、使用する酵素や緩衝液等が予めキット化された製剤として提供される。この場合、クリーニング反応混合物バイアル、変換反応混合物バイアル、サイクル反応混合物バイアル、検出反応混合物バイアルのように、各反応工程毎にバイアルを調製してキット化すると便利である。

本発明に使用する酵素等は、適当なガラス製またはプラスチック製容器のバイアル、アンプルに、例えば液剤、凍結乾燥剤または固形剤の形状で充填され、提供される。

酵素類は予め緩衝液、電解質液、蒸留水等で溶解されていてもよい。あるいは、複室容器に酵素と溶解液を別々に収容しておき、使用直前に混合してもよい。

また、適宜、保存剤、安定化剤、着色剤、賦形剤、pH 調整剤などの添加物を加えることもできる。

本発明の測定方法は、本明細書に記載した増幅反応を使用する他、適当な自動分析装置を用いて行ってもよい。

本発明は、アデニル酸シクラーゼ活性および c AMP 並びに c AMP 特異的ホスホジエステラーゼ活性および G 調節タンパク質の生物学的活性に関する非放射性の酵素的蛍光定量法を提供する。また、本発明は、グアニル酸シクラーゼ活性および c GMP の非放射的測定を提供する。

本発明の方法は、現在利用されているアデニル酸シクラーゼ活性等の測定方法

に比べて幾つかの利点を有する。即ち、本発明は、Y. Salomonらによって開示された従来法 [Anal. Biochem., 第58巻, 541頁(1974年); Adv. Cyclic Nucleotide Res., 第10巻, 35頁(1979年)] と異なり、放射性物質を一切使用しない。加えて、本発明の測定方法は、従来法に比べ高感度で、操作がより簡単である。

5 さらに、本発明者らが先に開発した酵素反応を用いた測定方法 [A. Sugiyama et al., Anal. Biochem., 第218巻, 20頁(1994年); A. Sugiyama et al., J. Clin. Lab., 第8巻, 437頁(1994年); A. Sugiyama et al., Anal. Biochem., 第225巻, 368頁(1995年); A. Sugiyama et al., Yamanashi Med. J., 第10巻, 11頁(1995年)] と比較しても、反応時間が著しく短縮され、操作もより簡便なものとなっている。また、従来方法では回避できなかった試料の白濁化をEDTAなどのキレート剤を用いることで解決した。そして、この方法を用いることで、 μg オーダーの生物学的試料中のcAMP量をpmolまたはfmolレベルで正確に定量することが可能である。

10 本発明のクリーニング反応は、cAMPより遙かに高濃度であり、除去しなければ実質的にブランクを高めるおそれのある全ての試料中の内因性ATP、ADPおよびAMPを除去することができる。さらに、同様に妨害物質として作用する試料中のグルコース-6-リン酸およびグリコーゲンも全て除去することができる。これらのクリーニング反応は、検出感度の向上のために重要である。

15 しかも本発明では、従来クリーニング反応に用いられていた4種類の酵素(アピラーゼ、5'-ヌクレオチダーゼ、アルカリホスファターゼおよびアデノシンデアミナーゼ)のうち、5'-ヌクレオチダーゼの使用を取りやめることにより、1時間を要していた反応時間が僅か5分乃至10分間程度に著しく短縮できることを見出した。

20 また、サイクル反応後、キレート剤により Mg^{2+} をトラップするので、加熱することなく過剰の酵素が不活性化することができ、試料が白濁しない。

25 本発明の測定方法の感度は、反応容量を減少させることによって高めることもできる。この感度は、Meinrich等またはE. Helmrich等 [E. Helmrich et al., Biochemistry, 第52巻, 647頁(1964年)] の方法を用いることにより、反応混合物中のグリコーゲンおよび無機リン酸の濃度を変えることによって更に高めるこ

ともできる。本発明は、 $10\mu\text{g}$ 程度の微量の哺乳動物組織の膜タンパク質中のアデニル酸シクラーゼ活性を測定することが可能である。

従来の $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ c AMPの比活性およびクロマトグラフィー分離などの容量サイズによって感度が制限される放射活性測定方法とは異なって、本発明の蛍光定量方法においては、感度を高めることに対して顕著な障害は存在していない。例えば、c AMPは広範な濃度範囲($1\text{ fmol}\sim 1\text{ nmol}$)で測定可能である。

実施例

本発明は、以下の実施例により更に詳細に説明される。これらの実施例においては使用した酵素、基質およびコファクターは、Boehringer Mannheim社から入手した。ただし、アピラーゼおよび5'-ヌクレオチダーゼはSigma社から入手した。 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP、 ^3H -c AMPおよびアクアゾルシンチレーションカクテルはNew England Nuclear社から購入した。Neutral Chromatographic Alumina WN-3はBio-Rad社製を用いた。

実施例1 クリーニング反応時間の設定

$3\mu\text{L}$ のATP標準品(0、10、100、1000および10000pmol/tube)を 10×57 のPyrex(商品名)製分析管に加えた。室温にて、クリーニング反応混合物(100mMのトリス-HCl、pH8.0; 2mMの MgCl_2 ; 2U/mLのアピラーゼ; 10U/mLのアデノシンデアミナーゼ; 40U/mLのアルカリホスファターゼ) $25\mu\text{L}$ を各分析管に加えた。この混合物を 37°C でインキュベートした(0、5、10、15および20分間)。以下、ステップ2-変換反応(AMP化反応)および変換オプション反応(ATP化反応)、ステップ3-検出サイクル反応2を行い、340nmにおける蛍光度を測定し、ATPが完全に消失するインキュベーション時間を求めた。結果を図1に示す。その結果、長くても10分間のインキュベーションで妨害物質のATPはほぼ消失することが判った。

比較実験

本願発明のクリーニング反応と5'-ヌクレオチダーゼを用いたクリーニング反応とを比較するために行われた。

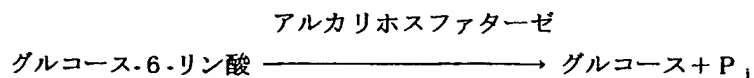
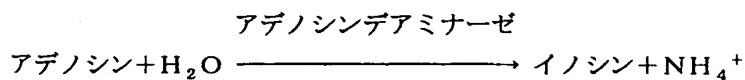
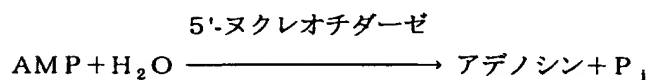
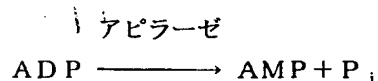
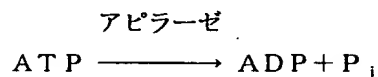
5'-ヌクレオチダーゼを含むクリーニング反応混合物の調製

トリス-HCl (pH 8.0)、MgCl₂、5'-ヌクレオチダーゼ、アピラーゼ、アデノシンデアミナーゼおよびアルカリホスファターゼに水を加えて全量 25 μLとし、表1に示す最終濃度を有するクリーニング反応混合物を調製した。

表1：クリーニング反応混合物

5	化合物	最終濃度
	トリス-HCl (pH 8.0)	100 mM
	MgCl ₂	2 mM
	5'-ヌクレオチダーゼ	2.5 U/mL
	アピラーゼ	2 U/mL
10	アデノシンデアミナーゼ	10 U/mL
	アルカリホスファターゼ	20 U/mL
	水	—

このクリーニング反応は以下の式で示すことができる。



クリーニング反応時間の設定

上記で調製したクリーニング反応混合物を用い、実施例1の方法に準じてクリーニング反応を行った。

3 μLのATP標準品 (0、10、100、1000および10000

pmol/tube) を 10×57 の Pyrex 製分析管に加えた。室温にて、上記で調製したクリーニング反応混合物 (100 mM の トリス-HCl ($\text{pH} 8.0$) ; 2 mM の MgCl_2 ; 2 U/mL の アピラーゼ ; 2.5 U/mL の $5'$ -ヌクレオチダーゼ ; 0.1 U/mL の アデノシンデアミナーゼ ; 20 U/mL の アルカリホスファターゼ) $25 \mu\text{L}$ を各分析管に加えた。この混合物を 37°C でインキュベートした。以下、実施例 2 に記載の変換反応、サイクル化反応および検出反応を行い、 340 nm における吸光度を測定し、ATP が完全に消失するインキュベーション時間を求めた。その結果、ATP を完全に消失させるためには、およそ 1 時間を要した。

10 実施例 2 酵素的蛍光定量による組織培養物における微量 cAMP 測定

(1) 試料および反応混合物の調製

A. 生物学的試料の調製(心室筋細胞の調製)

初代培養で増殖させた 1 日齢のラットの心臓から心室筋細胞を採取した。心臓あたり約 500 万個の心筋細胞が生存していた。 100 mm あたり約 100 万個の細胞密度で播いた後、皿細胞を 5% ウシ血清細胞を含有するハンクスの平衡塩類溶液を有する最少必須培地中で増殖させた [Simpson et al., Cir. Res., 第 51 巻, 787 頁 (1982 年)]。4 日目に培地を交換した。培養物は 90% 以上の心筋細胞を含有しており、細胞数は期間中一定であった [Simpson et al., Cir. Res., 第 51 巻, 787 頁 (1982 年) ; Rocha-Singh et al., J. Clin. Invest., 第 88 巻, 204 頁 (1991 年) ; Rocha-Singh et al., J. Clin. Invest., 第 88 巻, 706 頁 (1991 年)]。

6 プレーットの筋細胞を 2 群 ($n = 3$ プレート/群) に無作為抽出した。ホスホジエステラーゼインヒビター、3-イソブチル-1-メチルキサンチン (IBMX) を各群の培地に $2 \mu\text{M}$ の最終濃度となるように添加した。5 分後、一方の群にイソプロテレノールを $1 \mu\text{M}$ の最終濃度となるように添加し、刺激群とした。他方の群には追加的な薬品を加えなかった。5 分後、6 つの全プレートの細胞および細胞なしの培養培地プレートを合計 5 mL の 100% エタノールで溶出した。各皿から得られる溶出物の 10 分の 1 (0.5 mL) を採り、 $12 \times 75 \text{ mm}$ のホウケイ酸ガラス管中で風乾し、 -80°C で貯蔵した。残りの 4.5 mL も同様に風乾し、貯蔵した。測定時に、ペレットを解凍し、 0.5 N の過塩素酸 $100 \mu\text{L}$ に再度懸濁した。抽出物を 4°C

で2分間攪拌し、超音波処理器(Branson Cleaning Equipment社、A Smith-Kline社、米国)を使用して1分間超音波処理した。抽出物を25 μ Lの2 N KOHで中和し、2000gで30分間遠心した後、上清液80 μ Lを分析用に採取した。

B. クリーニング反応混合物の調製(ステップ1 クリーニング反応参照)

- 5 1 Mのトリス-HCl (pH8.0) 400 μ L、0.2 MのMgCl₂ 40 μ L、500 U/mLのアピラーゼ32 μ L、400 U/mLのアデノシンデアミナーゼ100 μ Lおよび4000 U/mLのアルカリホスファターゼ40 μ Lに水を加えて全量4 mLとし、クリーニング反応混合物を調製した(表2)。

表2 : クリーニング反応混合物

10	化合物	最終濃度
	トリス-HCl (pH8.0)	100mM
	MgCl ₂	2mM
	アピラーゼ	4U/mL
	アデノシンデアミナーゼ	10U/mL
15	アルカリホスファターゼ	40U/mL
	水	—

- 実施例2: (1) で調製したラット心室筋細胞調製物を氷冷した後、0.4 μ Lのステップ1-クリーニングオプション反応混合物(100 mMトリス-HCl (pH8.0)、3 mMのMgCl₂、3 U/mLのアピラーゼ、150 μ g/mLのアデノシンデアミナーゼ、30 U/mLのアルカリホスファターゼ、および75 μ g/mLのグリコーゲンホスホリラーゼ- α)を加えて、すべての内因性アデニンヌクレオチド、グリコーゲン、およびグルコース-6-リン酸を除去した。37℃で1時間インキュベーションした後、80℃で30分間加熱して、酵素を不活性化した。

- 25 C. 変換反応混合物の調製(ステップ2-変換反応およびステップ2-変換オプション反応参照)

1 Mのトリス-HCl (pH8.0) 400 μ L、0.2 MのMgCl₂ 40 μ L、4%のウシ血清アルブミン10 μ L、1 MのKCl 600 μ L、0.1 Mのジチオトレイトール80 μ L、0.1 μ MのATP 16 μ L、0.5 Mのホスホエノールピルビン酸24 μ L、2 U

/mLのホスホジエステラーゼ24 μ L、720U/mLのミオキナーゼ24 μ Lおよび2000U/mLのピルビン酸キナーゼ160 μ Lに水を加えて全量4mLとし、変換反応混合物を調製した(表3)。

表3：変換反応混合物

5	化合物	最終濃度
	トリス-HCl (pH8.0)	100mM
	MgCl ₂	2mM
	ウシ血清アルブミン	0.01%
	KCl	150mM
10	ジチオトレイトール	2mM
	ATP	40nM
	ホスホエノールピルビン酸	3mM
	ホスホジエステラーゼ	12mU/mL
	ミオキナーゼ	4.5U/mL
15	ピルビン酸キナーゼ	80U/mL
	水	—

D. サイクル反応混合物の調製(ステップ3—検出サイクル反応2)

1Mのトリス-HCl (pH8.0)400 μ L、0.2MのMgCl₂40 μ L、4%のウシ血清アルブミン10 μ L、0.1Mのフルクトース30 μ Lおよび1500U/mLのヘキソキナーゼ160 μ Lに水を加えて全量4mLとし、サイクル反応混合物を調製した(表4)。

表4：サイクル反応混合物

25	化合物	最終濃度
	トリス-HCl (pH8.0)	100mM
	MgCl ₂	2mM
	ウシ血清アルブミン	0.01%
	フルクトース	3mM
	ヘキソキナーゼ	60mM
	水	—

E. 検出反応混合物の調製(ステップ3ー検出反応2参照)

1 Mのトリス-HCl (pH 8.0) 2000 μ L、0.2 MのEDTA 320 μ L、0.1 MのNADP⁺ 120 μ L、3500 U/mLのホスホグルコイソメラーゼ 6 μ Lおよび1750 U/mLのグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ 6 μ Lに水を加えて全量4 mLとし、検出反応サイクルを調製した(表5)。

表5：検出反応混合物

化合物	最終濃度
トリス-HCl (pH 8.0)	100mM
EDTA	3.2mM
NADP ⁺	0.01%
ホスホグルコイソメラーゼフルクトース	1U/mL
グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ	0.5U/mL
水	—

(2)組織培養物における酵素的蛍光定量による微量cAMP測定

Aで調製した心室筋細胞調製物を試料とし、クリーニング反応、変換反応、サイクル反応および検出反応からなる一連の酵素的蛍光定量法によりcAMPを求めた。

1)クリーニング反応(ステップ1ークリーニング反応)

中和した3 μ L容量の筋細胞抽出物(100mmプレートから得られる総溶出物の2.4%または0.24%のいずれか)または3 μ LのcAMP標準品(0、3.6、7.2、14.4、21.6および28.8pmol/20 μ L)を10×57のPyrex製分析管(岩城硝子製)に加えた。室温にて、Bで調製した25 μ Lのクリーニング反応混合物(100mMのトリス-HCl (pH 8.0)；2mMのMgCl₂；2U/mLのアピラーゼ；10U/mLのアデノシンデアミナーゼ；40U/mLのアルカリホスファターゼ)を各分析管に加えた。この混合物を37℃で10分間インキュベートした。次に、90℃で30分間加熱して酵素を不活化した。同様に内部組織ブランクを調製した。

2)変換反応(ステップ2ー変換反応(AMP化反応)および

ー変換オプション反応(ATP化反応))

クリーニング反応の各分析管に、Cで調製した変換反応混合物(100mMのトリ

ス-HC l (p H8.0) ; 2mMのMgCl₂ ; 0.01%のウシ血清アルブミン ; 150mMのKC l ; 2mMのジチオトレイトール ; 40nMのATP ; 3mMのホスホエノールピルビン酸 ; 12mU/mLのホスホジエステラーゼ ; 4.5U/mLのミオキナーゼ ; 80U/mLのピルビン酸キナーゼ) 25 μ Lを添加した。室温で一晩インキュベーションした。分析管を90℃で5分間加熱して反応を終了させた。

3) サイクル反応(ステップ3-検出サイクル反応2)

変換反応の各分析管に、Dで調製したサイクル反応混合物(100mMのトリス-HC l (p H8.0) ; 2mMのMgCl₂ ; 0.01%のウシ血清アルブミン ; 3mMのフルクトース ; 60U/mLのヘキソキナーゼ) 25 μ lを添加した。反応当たりの酵素濃度が高いことを考慮して、これらの反応物を0℃にセットして全てのアッセイ管の開始時間を確実に同一にすることが重要であった。37℃で2時間インキュベート(およそ4000~10000サイクル)した。

4) 検出反応(ステップ3-検出反応2)

サイクル反応の各分析管に、Eで調製した検出反応混合物(100mMのトリス-HC l、p H8.0 ; 3.2mMのEDTA ; 0.6mMのNADP⁺ ; 1U/mLのホスホグルコイソメラーゼフルクトース ; 0.5U/mLのグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ) 125 μ Lを添加した。室温で20分間反応後、フルオロメーター(Optical Technology Devises社、ニューヨーク)を使用してNADPHの最終濃度を測定した。フルオロメーターは、10蛍光単位の読み取りが緩衝液(50mMのトリス-HC l、p H8.0) 900 μ L中1nmolのNADPHと等価になるようにセットした。

なお、個々の分析過程は、既知濃度の適当な基質を使用する内部対照を同時に分析することにより確認した(例えば、クリーニング反応をチェックするためにATPを追加して使用し、変換反応を評価するためにAMP標準直線を使用し、サイクル反応を評価するためにはATP標準直線を使用した)。

5) 測定結果

340nmでの吸光測定によってcAMP標準品(0、3.6、7.2、14.4、21.6および28.8pmol/20 μ L)から図2に示される標準cAMP直線が得られた。

また、(1)のAで調製した試料について、追加的な薬剤を加えなかった対照群およびイソプロテレノール刺激群中のcAMP含量を、各試料のプレートの1

／10の溶離液に関し、得られた標準cAMP直線(図2)を用いて測定し、cAMP 680 pmol/100mmプレートの実測値を得た。

本発明の方法、免疫比色キット(アマシャム・インターナショナル製)および放射免疫測定キット(アマシャム・インターナショナル製)を用いてcAMPを測定した結果を図3に示す。cAMP含量の測定結果は、公知の方法の放射活性測定法により得られた結果とよく一致しており、その差は通常の5%以下であった。

さらに、cAMPの定量結果からアデニル酸シクラーゼ活性を、本発明の方法、放射免疫測定法、およびSalomon法により求めた。その結果を図4に示す。アデニル酸シクラーゼ活性は、1分間あたりのタンパク質1mgにおけるcAMPの生成量(pmol)で示した。

実施例3

1Mのトリス-HCl (pH8.0)、0.2MのMgCl₂、1MのK₂HPO₄、0.1MのAMP、4000U/mLのアルカリホスファターゼ、および10mg/mLのグリコーゲンホスホリラーゼの適量を採り、水を加えて最終濃度が以下になるように、クリーニング反応混合液を調製した。

表6：クリーニング反応混合物

化合物	最終濃度
トリス-HCl (pH8.0)	100mM
MgCl ₂	2mM
K ₂ HPO ₄	5mM
AMP	0.1mM
アルカリホスファターゼ	20U/mL
グリコーゲンホスホリラーゼ	10μg/mL
水	—

1Mのトリス-HCl (pH8.0)、0.1MのMgCl₂、1MのK₂HPO₄、0.1MのAMP、0.1Mのジチオトレイトール、1mMのグルコース-1, 6-二リン酸、4%のウシ血清アルブミン、0.1MのNADP、10mg/mLのグリコーゲ

ンホスホリラーゼ、10mg/mLのホスホグルコムターゼ、および5mg/mLのグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼの適量を取り、水を加えて最終濃度が以下となるように、変換反応混合物を調製した。

5 表7：変換反応混合物

	化合物	最終濃度
	トリス-HCl (pH8.0)	100mM
	MgCl ₂	2mM
	K ₂ HPO ₄	5mM
10	AMP	0.1mM
	ジチオトレイトール	1mM
	グルコース-1, 6-ニリン酸	4μM
	ウシ血清アルブミン	0.01%
	NADP	0.2mM
15	グリコーゲンホスホリラーゼ	20μg/mL
	ホスホグルコムターゼ	4μg/mL
	グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ	2μg/mL
	水	—

1) クリーニング反応 (ステップ1-クリーニングオプション反応2)

20 206μMのグリコーゲンを含有するグリコーゲン溶液を調製し、12本のPyrex製分析管 (岩城硝子製：10×57mm) に分注し (0、20、40および80μLを各3本)、蒸留水を加えて全量を80μLとした。室温にて、500μLのクリーニング反応混合液 (100mMのトリス-HCl (pH8.0) ; 2mMのMgCl₂ ; 5mMのK₂HPO₄ ; 0.1mMのAMP ; 20U/mLのアルカリホスファターゼ ; 10μg/mLの

25 グリコーゲンホスホリラーゼ) を各分析管に加えた。この混合物を37℃で60分間インキュベートした。

2) 検出反応 (ステップ3-検出反応1)

クリーニング反応の各分析管に、変換反応混合物 (100mMのトリス-HCl (pH8.0) ; 2mMのMgCl₂ ; 5mMのK₂HPO₄ ; 0.1mMのAMP ; 1mMの

ジチオトレイトール；4 μ Mのグルコース-1, 6-リン酸；0.01%のウシ血清アルブミン；0.2mMのNADP；20 μ g/mLのグリコーゲンホスホリラーゼ；4 μ g/mLのホスホグルコムターゼ；2 μ g/mLのグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ) 500 μ Lを添加した。37°Cで30分間インキュベーションした。各分析管につき励起波長340nmにおける460nmの蛍光波長を測定した。その結果、グリコーゲン溶液中のグリコーゲンがすべてクリーニング反応により消失していることを確認した。

実施例4 キレート剤による白濁防止効果

実施例2のサイクル反応後の分析管に、EDTAを含まない検出反応混合物(100mMのトリス-HCl、pH8.0；0.6mMのNADP⁺；1 U/mLのホスホグルコイソメラーゼ；0.5 U/mLのグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ)125 μ Lを添加し、90°Cで30分間加熱し、酵素を失活させた。試料液の白濁の程度を目視観察した。また、実施例2で得られた検出反応混合物添加溶液(EDTA-室温で酵素を失活させたもの)を対照とした。

その結果、加熱失活の場合は試料溶液が白濁したのに対し、EDTAを用いた場合は、試料溶液は澄明であった。

産業上の利用の可能性

本発明によって、生物学的試料中のcAMP量またはアデニル酸シクラーゼ活性を、放射能試薬を使用しないで測定する方法が提供される。

即ち、本発明によれば、妨害物質であるATPやADP、AMPなどの内因性非環状アデニンヌクレオチド類やグルコース-6-リン酸を酵素を用いたクリーニング反応により選択的かつ効率的に除去できる。そして、試料中のcAMPをAMPに酵素的に変換した後、ATPに変換する。そしてさらに、ATPをフルクトース-6-リン酸を経由してグルコース-6-リン酸に変換後、NADPHに変換し、このNADPH濃度を蛍光光度法で測定し、cAMP濃度と相関させることによって、有害な放射性物質を用いることなく、酵素反応・化学反応のみで安全にcAMP量およびそれに対応するアデニル酸シクラーゼ活性を測定できる。

特に本発明においては、クリーニング反応に使用する酵素をアピラーゼ、アル

カリホスファターゼおよびアデノシンデアミナーゼに限定し、さらにその濃度を調整することにより、操作を簡便なものとするともに、反応時間を $1/6 \sim 1/12$ と劇的に短縮させることに成功した。

5 cAMP量は、細胞の栄養、増殖、分化、適応状態に左右され敏感に変動することから、cAMP量を測定することによって、細胞の生存度、内分泌ホルモン軸機能、アデニル酸シクラーゼ活性、ホスホジエステラーゼ活性を評価することができ、これらの評価値は、基礎医学および臨床医学分野において重要な指標となり得る。

10 本発明の方法を用いることによって、かかるcAMP量およびそれに対応するアデニル酸シクラーゼ活性の安全かつ高感度な測定が可能となった。

請 求 の 範 囲

1. 生物学的試料中の内因性ATP、ADPおよびAMPからなる非環状アデニヌクレオチド類および内因性グルコース-6-リン酸をより迅速に除去する方法であって、生物学的試料を非環状アデニヌクレオチド類およびグルコース-6-リン酸を除去するのに効果的な量のアピラーゼ、アルカリホスファターゼおよびアデノシンデアミナーゼを用いて処理することを特徴とする方法。

2. 生物学的試料中のcAMP量またはアデニル酸シクラーゼ活性の測定方法であって、

クリーニング反応：生物学的試料を内因性ATP、ADPおよびAMPからなる非環状アデニヌクレオチド類およびグルコース-6-リン酸を除去するのに効果的な量のアピラーゼ、アルカリホスファターゼおよびアデノシンデアミナーゼを用いて処理する工程、

変換反応：生物学的試料中のcAMPをAMPに酵素的に変換する工程、

検出反応：放射性試薬を用いることなくAMP量を測定する工程、を含むことを特徴とする方法。

3. 上記クリーニング反応において、上記試料にさらに、有効量のグルコースオキシダーゼ、グリコーゲンホスホリラーゼおよびアルカリホスファターゼを加えて処理し、上記試料から内因性グリコーゲンを酵素的に除去することを含む、請求項2記載の方法。

4. 上記変換反応が上記試料を有効量のホスホジエステラーゼによる処理により行われる、請求項2記載の方法。

5. cAMPからAMPへの上記変換反応の酵素がcAMPを変換させた後にキレート剤により不活性化される、請求項2記載の方法。

6. キレート剤がEDTAである、請求項5記載の方法。

7. 上記検出反応が、添加された無機リン酸の存在下、同じく添加されたグリコーゲンをグリコーゲンホスホリラーゼと接触させて、グルコース-1-リン酸に変換されることを含み、そしてこの変換が試料に含まれるAMPによってin

vitroで活性化されるものである、請求項2記載の方法。

8. 上記検出反応において、さらに、グルコース-1-リン酸をグルコース-6-リン酸に変換させるのに有効な量のホスホグルコムターゼで上記試料を処理し、
5 ついでグルコース-6-リン酸を6-ホスホグルコノラクトンに変換するのに有効な量のグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼおよびNADP⁺で上記試料を
処理することによって、グルコース-1-リン酸を6-ホスホグルコノラクトンおよびNADPHに変換する、請求項7記載の方法。

9. 上記検出反応において、さらに、上記試料を水の存在下で加熱して、6-
10 ホスホグルコノラクトンを6-ホスホグルコン酸に変換し、ついでこの6-ホスホ
グルコン酸をリブローズ-5-リン酸およびNADPHに変換するのに有効な量の
NADP⁺を添加することを含む、請求項8記載の方法。

10. 生物学的試料中のcAMP量またはアデニル酸シクラーゼ活性の測定方法であって、

クリーニング反応：生物学的試料を、上記試料中のcAMP以外の内因性非環
15 状アデニンヌクレオチド類、および内因性グルコース-6-リン酸を酵素的に除去
するのに有効な量のアピラーゼ、アデノシンデアミナーゼおよびアルカリホスファターゼで処理する工程、

変換反応：生物学的試料中のcAMPをATPに酵素的に変換する工程、

検出反応：ATPをフルクトース-6-リン酸に酵素的に変換し、フルクトース
20 -6-リン酸を6-ホスホグルコノラクトンおよびNADPHに酵素的に変換後、
放射性物質を用いずにNADPH濃度を測定する工程
を含むことを特徴とする方法。

11. 上記クリーニング反応において、さらに、上記試料を有効量のグルコースオキシダーゼ、グリコーゲンホスホリラーゼおよびアルカリホスファターゼで
25 処理し、上記試料から内因性グリコーゲンを酵素的に除去することを含む、請求
項10記載の方法。

12. 上記検出反応において、フルクトース-6-リン酸を6-ホスホグルコノラクトンおよびNADPHに酵素的に変換後、さらに、引き続き反応混合物を加熱し、そして上記反応混合物に6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼおよびN

ADP⁺を添加することによって上記6-ホスホグルコノラクトンをリブローズ-5-リン酸およびNADPHに変換することを含む、請求項10または11記載の方法。

13. 上記クリーニング反応のcAMP以外の内因性非環状アデニンヌクレオチド類が、ATP、ADP、AMPの1種またはそれ以上の混合物である、請求項10記載の方法。

14. 上記変換反応において、cAMPからATPの変換が有効量のホスホジエステラーゼ、ミオキナーゼおよびピルビン酸キナーゼの組み合わせで行われる、請求項10記載の方法。

15. 上記検出反応において、ATPからフルクトース-6-リン酸の変換がヘキソキナーゼおよびピルビン酸キナーゼの組み合わせで行われる、請求項10記載の方法。

16. 上記検出反応において、フルクトース-6-リン酸から6-ホスホグルコノラクトンおよびNADPHの変換がホスホグルコイソメラーゼおよびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼの組み合わせで行われる、請求項10記載の方法。

17. 上記検出反応において、ATPをフルクトース-6-リン酸に変換する酵素が非環状アデニンヌクレオチド類の変換後にキレート剤により不活性化される、請求項10記載の方法。

18. キレート剤がEDTAである、請求項17記載の方法。

19. 上記生物学的試料が、哺乳動物組織である、請求項1、2または10記載の方法。

20. 上記生物学的試料が、生物学的液体である請求項1、2または10記載の方法。

21. 生物学的試料中のcAMP量またはアデニル酸シクラーゼ活性の測定用キットであって、(1)生物学的試料中の内因性ATP、ADPおよびAMPからなる非環状アデニンヌクレオチド類および内因性グルコース-6-リン酸除去するのに効果的な量のアピラーゼ、アルカリホスファターゼおよびアデノシンデアミナーゼを含むクリーニング反应用バイアルキット、

(2)生物学的試料中のcAMPをAMPに酵素的に変換するための有効量のホ

スホジエステラーゼを含む変換反応用バイアルキット、および

(3) グリコーゲンからグルコース-1-リン酸への変換のためのグリコーゲン、
無機リン酸、グリコーゲンホスホリラーゼ、グルコース-1-リン酸からグルコー
ス-6-リン酸への変換のためのホスホグルコムターゼ、およびグルコース-6-
リン酸から6-ホスホグルコノラクトンおよびNADPHへの変換のためのグル
コース-6-リン酸デヒドロゲナーゼおよびNADP⁺を含む検出反応用バイアル
キット

を含むことを特徴とするキット。

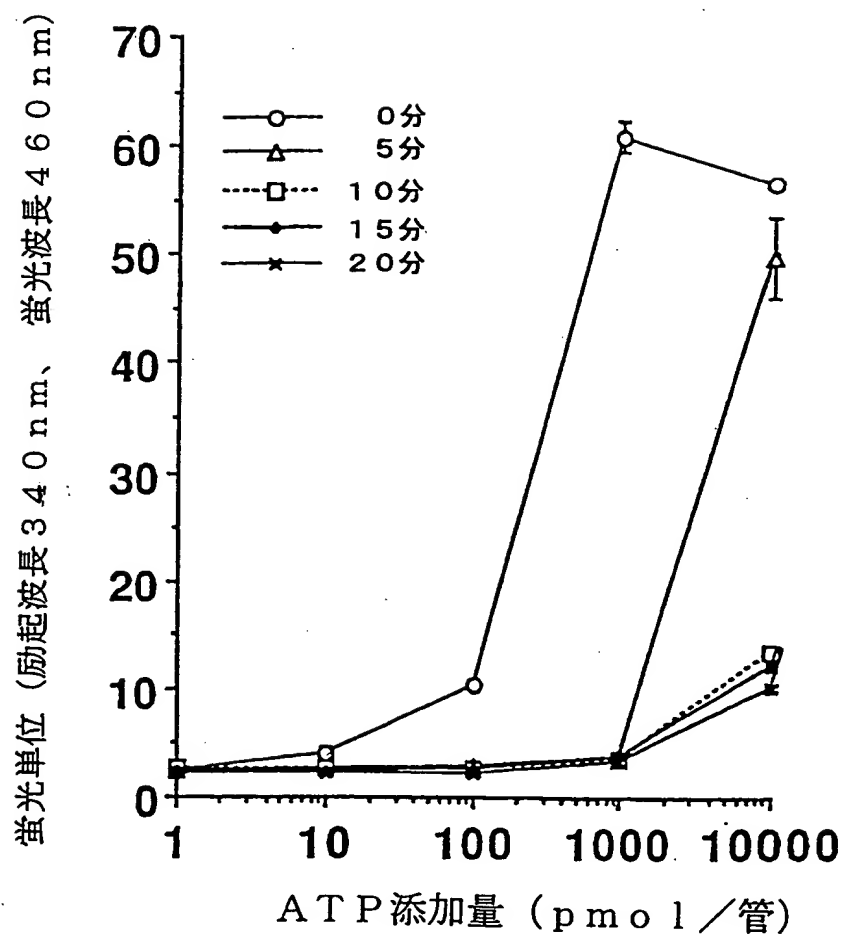
22. 生物学的試料中のcAMP量またはアデニル酸シクラーゼ活性の測定用
キットであって、(1)生物学的試料中のcAMP以外の内因性非環状アデニンヌ
クレオチド類、および内因性グルコース-6-リン酸を酵素的に除去するのに有効
な量のアピラーゼ、アデノシンデアミナーゼおよびアルカリホスファターゼを含
むクリーニング反応用バイアルキット、

(2)生物学的試料中のcAMPからATPの酵素的変換のための有効量のホス
ホジエステラーゼ、ATP、ミオキナーゼ、ホスホエノールピルビン酸およびピ
ルビン酸キナーゼを含む変換反応用バイアルキット、および

(3)ATPからフルクトース-6-リン酸の変換のためのフルクトースおよびヘ
キソキナーゼ、フルクトース-6-リン酸から6-ホスホグルコノラクトンおよび
NADPHの変換のためのホスホグルコイソメラーゼ、グルコース-6-リン酸
デヒドロゲナーゼおよびNADP⁺を含む検出反応用バイアルキット
を含むことを特徴とするキット。

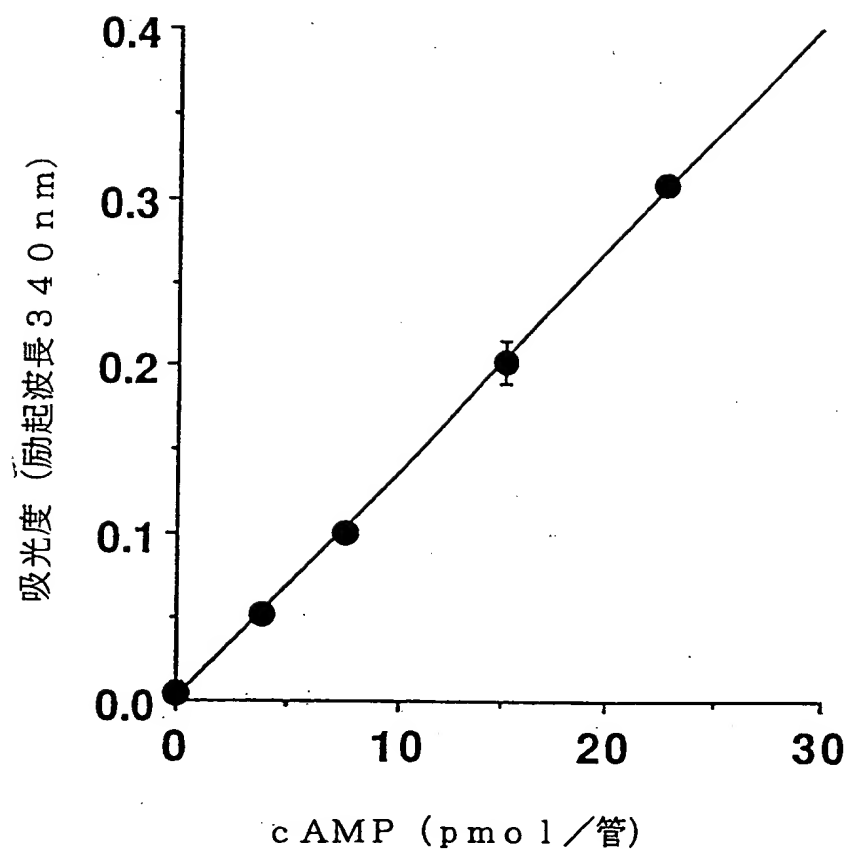
1 / 4

Fig. 1



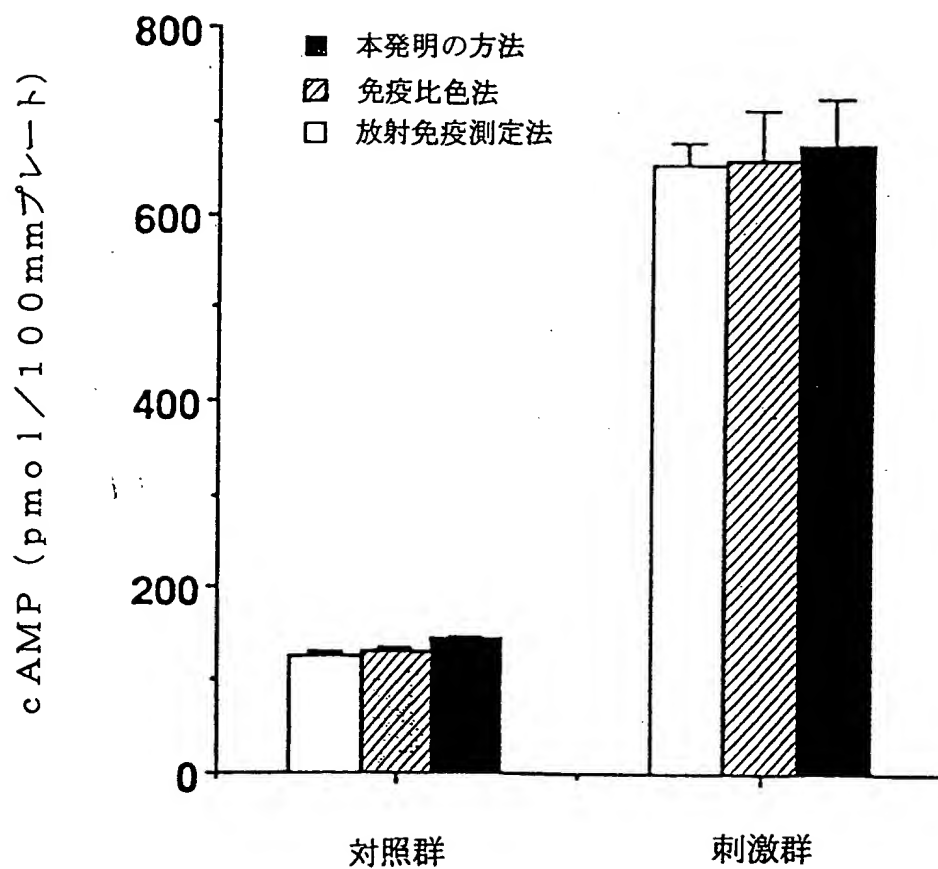
2 / 4

Fig. 2



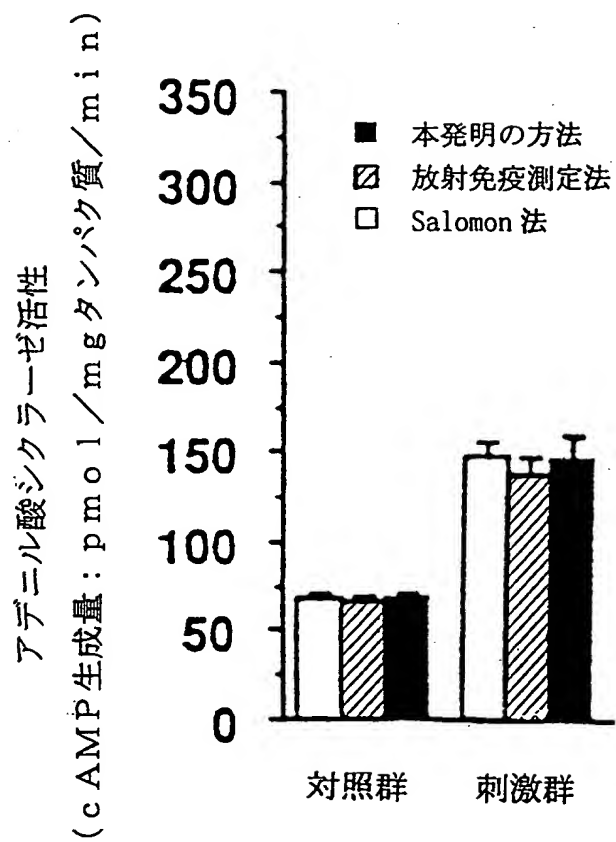
3 / 4

Fig. 3



4 / 4

Fig. 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01494

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12Q1/06, C12Q1/34, C12Q1/42, C12Q1/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12Q1/00-1/52

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG

CA (STN)

MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	US, 5618665, A (Regents of the University of Minnesota), 31 May, 1994 (31.05.94), & WO94/17198, A	1-2 4-9, 21
Y	EP, 781851, A1 (KIKKOMAN CORP), 02 July, 1997 (02.07.97) & JP, 9-182600, A & US, 5891702, A	1
A	EP, 794260, A1 (KIKKOMAN CORP), 10 September, 1997 (10.09.97) & JP, 9-234099, A & US, 5891659, A	1-22

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06 June, 2000 (06.06.00)Date of mailing of the international search report
20 June, 2000 (20.06.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/01494

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12Q1/06, C12Q1/34, C12Q1/42, C12Q1/48

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12Q1/00~1/52

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG)

CA (STN)

MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	US, 5618665, A (Regents of the University of Minne	1-2
Y	sota) 31. 5月. 1994 (31. 05. 94) & WO94/1	4-9, 21
	7198, A	
Y	EP, 781851, A1 (KIKKOMAN CORP) 02. 7月. 199	1
	7 (02. 07. 97) & JP, 9-182600, A&US, 5	
	891702, A	
A	EP, 794260, A1 (KIKKOMAN CORP) 10. 9月. 199	1-22
	7 (10. 09. 97) & JP, 9-234099, A&US, 5	
	891659, A	

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06. 06. 00

国際調査報告の発送日

20.06.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

印

4N 8114

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

PTO/PCT Rec'd 10 SEP 2001

1/4

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 2000年03月09日 (09.03.2000) 木曜日 15時48分51秒

661450

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号.	
0-2	国際出願日	
0-3	(受付印)	
0-4	様式-PCT/RO/101 この特許協力条約に基づく国際出願願書は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.90 (updated 15.12.1999)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	661450
I	発明の名称	c AMP およびアデニル酸シクラーゼの酵素的蛍光定量アッセイ
II	出願人	出願人である (applicant only)
II-1	この欄に記載した者は	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
II-2	右の指定国についての出願人である。	扶桑薬品工業株式会社 FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD. 541-0045 日本国 大阪府 大阪市 中央区道修町1丁目7番10号 7-10, Doshomachi 1-chome, Chuo-ku Osaka-shi, Osaka 541-0045 Japan
II-4ja	名称	
II-4en	Name	
II-5ja	あて名:	
II-5en	Address:	
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-1	その他の出願人又は発明者	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-1-1	この欄に記載した者は	米国のみ (US only)
III-1-2	右の指定国についての出願人である。	杉山 篤 SUGIYAMA, Atsushi 406-0023 日本国 山梨県 東八代郡 石和町八田73-5 73-5, Hatta, Isawacho Higashiyatsushiro-gun, Yamanashi 406-0023 Japan
III-1-4ja	氏名 (姓名)	
III-1-4en	Name (LAST, First)	
III-1-5ja	あて名:	
III-1-5en	Address:	
III-1-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-1-7	住所 (国名)	日本国 JP



特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 2000年03月09日 (09.03.2000) 木曜日 15時48分51秒

661450

IV-1	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。	代理人 (agent)
IV-1-1ja IV-1-1en IV-1-2ja	氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:	青山 稔 AOYAMA, Tamotsu 540-0001 日本国 大阪府 大阪市 中央区域見1丁目3番7号IMPビル 青山特許事務所
IV-1-2en	Address:	Aoyama & Partners IMP Building, 3-7, Shiromi 1-chome, Chuo-ku Osaka-shi, Osaka 540-0001 Japan
IV-1-3 IV-1-4	電話番号 ファクシミリ番号	(06) 6949-1261 (06) 6949-0361
IV-2	その他の代理人	筆頭代理人と同じあて名を有する代理人 (additional agent(s) with same address as first named agent)
IV-2-1ja IV-2-1en	氏名 Name(s)	田村 恭生; 大角 美佐子 TAMURA, Yasuo; OHSUMI, Misako
V	国の指定	
V-1	広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	AP: GH GM KE LS MW SD SL SZ TZ UG ZW 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国である他の国 EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国である他の国 EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国 OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GW ML MR NE SN TD TG 及びアフリカ知的所有権 機構と特許協力条約の締約国である他の国
V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	AE AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA CH&LI CN CR CU CZ DE DK DM EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS KE KG KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW
V-3	国内特許(この版の EASY の配布後に特許協力条約の締約国になった国)	DZ

特許協力条約に基づく国際出願願書

661450

原本(出願用) - 印刷日時 2000年03月09日 (09.03.2000) 木曜日 15時48分51秒



V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて、規則4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約のもとで認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、V-6欄に示した国の指定を除く。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。	
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)
VI-1	先の国内出願に基づく優先権主張	
VI-1-1	先の出願日	1999年03月18日 (18.03.1999)
VI-1-2	先の出願番号	平成11年特許願第073690号
VI-1-3	国名	日本国 JP
VI-2	優先権 証明書送付の請求 上記の先の出願のうち、右記の番号のものについては、出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁に対して請求している。	VI-1
VII-1	特定された国際調査機関 (ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)
VIII	照合欄	用紙の枚数
VIII-1	願書	4
VIII-2	明細書	36
VIII-3	請求の範囲	4
VIII-4	要約	1
VIII-5	図面	4
VIII-7	合計	49
VIII-8	添付書類	添付
VIII-8	手数料計算用紙	✓
VIII-9	別個の記名押印された委任状	✓
VIII-16	PCT-EASYディスク	-
VIII-17	その他	納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面
VIII-17	その他	国際事務局の口座への振込を証明する書面
VIII-18	要約書とともに提示する図の番号	
VIII-19	国際出願の使用言語名:	日本語 (Japanese)
IX-1	提出者の記名押印	
IX-1-1	氏名(姓名)	青山 葆
受理官庁記入欄		
10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	

特許協力条約に基づく国際出願願書

661450

原本（出願用） - 印刷日時 2000年03月09日（09.03.2000）木曜日 15時48分51秒

10-2	図面：	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であつてその後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	

国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--

PATENT COOPERATION TREATY

(b)

PCT Rec'd 10 SEP 2000

PCT

12.5.30

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

AOYAMA, Tamotsu
Aoyama & Partners
IMP Building, 3-7, Shiromi 1-
chome, Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka 540-0001
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 16 May 2000 (16.05.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 661450	
International application No. PCT/JP00/01494	
International publication date (day/month/year) Not yet published	
Applicant FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD. et al	International filing date (day/month/year) 13 March 2000 (13.03.00) Priority date (day/month/year) 18 March 1999 (18.03.99)

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
18 Marc 1999 (18.03.99)	11/73690	JP	28 Apr 2000 (28.04.00)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Carlos Naranjo

Telephone No. (41-22) 338.83.38

PTO/PCT Rec'd 10 SEP 2001

特許協力条約に基づく国際出願
国際予備審査請求書



第 II 章

出願人は、次の国際出願が特許協力条約に従って国際予備審査の対象とされることを請求し、
選択資格のある全ての国を選択する。ただし、特段の表示がある場合を除く。

国際予備審査機関記入欄

国際予備審査機関の確認		請求書の受理の日	
第 I 欄 国際出願の表示		出願人又は代理人の書類記号 661450	
国際出願番号 PCT/JP00/01494	国際出願日 (日. 月. 年) 13.03.00	優先日 (最先のもの) (日. 月. 年) 18.03.99	
発明の名称 cAMP およびアデニル酸シクラーゼの酵素的蛍光定量アッセイ			
第 II 欄 出願人			
氏名 (名称) 及びあて名 : (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)		電話番号 :	
扶桑薬品工業株式会社 FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.			
〒541-0045 日本国大阪府大阪市中央区道修町 1 丁目 7 番 10 号 7-10, Doshomachi 1-chome, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 541-0045 Japan		ファクシミリ番号 :	
		加入電話番号 :	
国籍 (国名) : 日本国 J P	住所 (国名) : 日本国 J P		
氏名 (名称) 及びあて名 : (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)			
杉山 篤 SUGIYAMA, Atsushi			
〒406-0023 日本国山梨県東八代郡石和町八田 73-5 73-5, Hatta, Isawacho, Higashiyatsushiro-gun, Yamanashi 406-0023 Japan			
国籍 (国名) : 日本国 J P	住所 (国名) : 日本国 J P		
氏名 (名称) 及びあて名 : (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)			
国籍 (国名) :	住所 (国名) :		
<input type="checkbox"/> その他の出願人が続葉に記載されている。			

第III欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

下記に記載された者は、☒ 代理人 又は ☐ 共通の代表者 として

☒ 既に選任された者であって、国際予備審査についても出願人を代理する者である。

☐ 今回新たに選任された者である。先に選任されていた代理人又は共通の代表者は解任された。

☐ 既に選任された代理人又は共通の代表者に加えて、特に国際予備審査機関に対する手続きのために、今回新たに選任された者である。

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

6 2 1 4 弁理士 青山 稜 AOYAMA, Tamotsu

6 8 5 2 弁理士 田村 恭生 TAMURA, Yasuo

9 6 0 7 弁理士 大角 美佐子 OHSUMI, Misako

〒540-0001 日本国大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号

IMPビル 青山特許事務所

Aoyama & Partners, IMP Building, 3-7, Shiromi 1-chome,
Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka 540-0001 Japan

電話番号：

06-6949-1261

ファクシミリ番号：

06-6949-0361

加入電信番号：

☐ 通知のためのあて名：代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す。

第IV欄 国際予備審査に対する基本事項

補正に関する記述：*

1. 出願人は、次のものを基礎として国際予備審査を開始することを希望する。

☒ 出願時の国際出願を基礎とすること。

☐ 明細書に関して ☐ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

☐ 請求の範囲に関して ☐ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第19条の規定に基づいてなされた補正（添付した説明書も含む）を基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

☐ 図面に関して ☐ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

2. ☐ 出願人は、特許協力条約第19条の規定に基づく請求の範囲について行った補正を無視し、かつ、取り消されたものとみなして開始することを希望する。

3. ☐ 出願人は、国際予備審査の開始が優先日から20月経過後まで延期されることを希望する（ただし、国際予備審査機関が、特許協力条約第19条の規定に基づき行われた補正書の写しの受領、又は当該補正を希望しない旨の出願人からの通知を受領した場合を除く（規則69.1(d)））。
（この口は、特許協力条約第19条の規定に基づく期間が満了していない場合のみ、レ印を付すことができる。）

* 記入がない場合は、1) 補正がない又は国際予備審査機関が補正（原本又は写し）を受領していないときは、出願時の国際出願を基礎に予備審査が開始され、2) 国際予備審査機関が、見解書又は予備審査報告書の作成開始前に補正（原本又は写し）を受領したときは、これらの補正を考慮して予備審査が開始又は続行される。

国際予備審査を行うための言語は...日本語...であり、

☒ 国際出願の提出時の言語である。

☐ 国際調査のために提出した翻訳文の言語である。

☐ 国際出願の公開の言語である。

☐ 国際予備審査の目的のために提出した翻訳文の言語である。

第V欄 国の選択

出願人は、選択資格のある全ての指定国（即ち、既に出願人によって指定されており、かつ特許協力条約第II章に拘束されている国）を選択する。

ただし、出願人は次の国の選択を希望しない。：

第VI欄 照合欄

この国際予備審査請求書には、国際予備審査のために、第IVに記載する言語による書類が添付されている。

国際予備審査機関記入欄

受 領 未 受 領

1. 国際出願の翻訳文・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 枚
2. 特許協力条約第34条の規定に基づく補正書・・・・・・・・・・ 枚
3. 特許協力条約第35条の規定に基づく補正書
(又は、要求された場合は翻訳文)の写し・・・・・・・・・・ 枚
4. 特許協力条約第35条の規定に基づく説明書
(又は、要求された場合は翻訳文)の写し・・・・・・・・・・ 枚
5. 書類・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 枚
6. その他 (書類名を具体的に記載する) : 枚

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

この国際予備審査請求書には、さらに下記の書類が添付されている。

1. ☒ 手数料計算用紙
2. ☐ 別個の記名押印された委任状
3. ☐ 包括委任状の写し
4. ☐ 記名押印 (署名) に関する説明書
5. ☐ スクレオキシド又はアミク/酸配列表
6. ☐ その他 (書類名を具体的に記載する) :

第VII欄 提出者の記名押印

各人の氏名 (名称) を記載し、その次に押印する。

青山 葆



国際予備審査機関記入欄

1. 国際予備審査請求書の実際の受理の日

2. 規則 60.1(b)の規定による国際予備審査請求書の受理の日の訂正後の日付

3. ☐ 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理。ただし、以下の4、5の項目にはあてはまらない。 ☐ 出願人に通知した。

4. ☐ 規則 80.5により延長が認められている優先日から19月の期間内の国際予備審査請求書の受理

5. ☐ 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理であるが規則82により認められる。

国際事務局記入欄

国際予備審査請求書の国際予備審査機関からの受領の日:

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類7 C12Q 1/06, 1/34, 1/42, 1/48	A1	(11) 国際公開番号 WO00/55356 (43) 国際公開日 2000年9月21日(21.09.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/01494 (22) 国際出願日 2000年3月13日(13.03.00) (30) 優先権データ 特願平11/73690 1999年3月18日(18.03.99) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 扶桑薬品工業株式会社 (FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.)(JP/JP) 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号 Osaka, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 杉山 篤(SUGIYAMA, Atsushi)(JP/JP) 〒406-0023 山梨県東八代郡石和町八田73-5 Yamanashi, (JP) (74) 代理人 青山 葆, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)	(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書	

(54)Title: ENZYMATIC FLUORIMETRIC ASSAY OF cAMP AND ADENYLATE CYCLASE

(54)発明の名称 cAMPおよびアデニル酸シクラーゼの酵素的蛍光定量アッセイ

(57) Abstract

A method for quickly assaying the cAMP content or the adenylate cyclase activity in a biological sample containing endogenous non-cyclic adenine nucleotides without resort to any radioactive reagents. More particularly, a method for assaying the cAMP content or the adenylate cyclase activity in a biological sample containing endogenous non-cyclic adenine nucleotides selected from the group consisting of cAMP formed by endogenous adenylate cyclase, ATP, AMP, ADP and mixtures thereof which comprises: (1) adding efficacious amounts of apyrase, adenosine deaminase and alkaline phosphatase to the above sample to thereby enzymatically remove the endogenous non-cyclic adenine nucleotides other than cAMP and glyco-6-phosphate therefrom; (2) enzymatically converting cAMP into AMP; and (3) thus quantitating AMP without resort to any radioactive substances; and a kit for performing this method.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01494

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12Q1/06, C12Q1/34, C12Q1/42, C12Q1/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12Q1/00-1/52

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG

CA (STN)

MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	US, 5618665, A (Regents of the University of Minnesota), 31 May, 1994 (31.05.94), & WO94/17198, A	1-2 4-9, 21
Y	EP, 781851, A1 (KIKKOMAN CORP), 02 July, 1997 (02.07.97) & JP, 9-182600, A & US, 5891702, A	1
A	EP, 794260, A1 (KIKKOMAN CORP), 10 September, 1997 (10.09.97) & JP, 9-234099, A & US, 5891659, A	1-22

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06 June, 2000 (06.06.00)Date of mailing of the international search report
20 June, 2000 (20.06.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12Q1/06, C12Q1/34, C12Q1/42, C12Q1/48

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12Q1/00~1/52

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG)

CA (STN)

MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	US, 5 6 1 8 6 6 5, A (Regents of the University of Minnesota) 31. 5月. 1994 (31. 05. 94) & WO 94/1 7 1 9 8, A	1-2 4-9, 21
Y	EP, 7 8 1 8 5 1, A1 (KIKKOMAN CORP) 02. 7月. 1997 (02. 07. 97) & JP, 9-1 8 2 6 0 0, A&US, 5 8 9 1 7 0 2, A	1
A	EP, 7 9 4 2 6 0, A1 (KIKKOMAN CORP) 10. 9月. 1997 (10. 09. 97) & JP, 9-2 3 4 0 9 9, A&US, 5 8 9 1 6 5 9, A	1-22

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06. 06. 00

国際調査報告の発送日

20.06.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

4N

8114

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

受付

12.10.2

山特許審判部

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

AOYAMA, Tamotsu
Aoyama & Partners
IMP Building, 3-7, Shiromi 1-
chome, Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka 540-0001
JAPONNOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

Date of mailing (day/month/year) 21 September 2000 (21.09.00)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference 661450			
International application No. PCT/JP00/01494	International filing date (day/month/year) 13 March 2000 (13.03.00)	Priority date (day/month/year) 18 March 1999 (18.03.99)	
Applicant FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD. et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
AU,DZ,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AE,AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,EA,EE,EP,ES,FI,GB,GD,
GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,
NZ,OA,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on
21 September 2000 (21.09.00) under No. WO 00/55356

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer J. Zahra Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/JP00/01494

PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

T :

AOYAMA, Tamotsu
Aoyama & Partners
IMP Building, 3-7, Shiromi 1-
chome, Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka 540-0001
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 30 October 2000 (30.10.00)		
Applicant's or agent's file reference 661450		IMPORTANT INFORMATION
International application No. PCT/JP00/01494	International filing date (day/month/year) 13 March 2000 (13.03.00)	Priority date (day/month/year) 18 March 1999 (18.03.99)
Applicant FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD. et al		

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

AP : GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW
EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE
National : AU, BG, CA, CN, CZ, DE, DZ, IL, KR, MN, NO, NZ, PL, RO, RU, SE, SK, US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM
OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG
National : AE, AL, AM, AT, AZ, BA, BB, BR, BY, CH, CR, CU, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IN, IS, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MW, MX, PT, SD, SG, SI, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer: R. Forax</p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
---	--

PCT


国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕

出願人又は代理人 の書類記号 661450	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/01494	国際出願日 (日.月.年) 13.03.00	優先日 (日.月.年) 18.03.99
国際特許分類 (IPC) Int. C1' C12Q1/06, C12Q1/34, C12Q1/42, C12Q1/48		
出願人 (氏名又は名称) 扶桑薬品工業株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で _____ ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 24.08.00	国際予備審査報告を作成した日 24.01.01		
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員)	4N	8114
	鈴木 恵理子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- | | | |
|-------------------------------------|----------------|---|
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ ページ、 | 出願時に提出されたもの
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ ページ、 | |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ ページ、 | |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | 出願時に提出されたもの
PCT19条の規定に基づき補正されたもの
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ ページ/図、 | 出願時に提出されたもの
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ ページ/図、 | |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ ページ/図、 | |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、 | 出願時に提出されたもの
国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、 | |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、 | |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲 1-22

請求の範囲

有
無

進歩性(IS)

請求の範囲 1-22

請求の範囲

有
無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲 1-22

請求の範囲

有
無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲1-22について

国際調査報告で引用した文献1、2(US, 5618665, A (Regents of the University of Minnesota) 31. 5月. 1994 (31. 05. 94)、EP, 781851, A1 (KIKKOMAN CORP) 02. 7月. 1997 (02. 07. 97))には、請求の範囲1の発明の特徴である、非環状アデニンヌクレオチド類及び内因性グルコース-6-リン酸を除去するために、アピラーゼ、アルカリフォスファターゼ、及びアデノシンデアミナーゼの3酵素を併用することは記載も示唆もされていない。一方、請求の範囲1の発明においては、上記3酵素を併用することにより、上記文献1、2から予測できない程の効果が奏せられており、新規性、進歩性を有する。

また、請求の範囲1の発明を技術的に限定化、具体化した請求の範囲2-20の発明、及び請求の範囲1の発明を実施するためのキットに関する請求の範囲21、22の発明も、同様に新規性、進歩性を有する。

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
(PCT36条及びPCT規則70)

REC'D 09 FEB 2001

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 661450	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/01494	国際出願日 (日.月.年) 13.03.00	優先日 (日.月.年) 18.03.99
国際特許分類(IPC) Int. C1' C12Q1/06, C12Q1/34, C12Q1/42, C12Q1/48		
出願人(氏名又は名称) 扶桑薬品工業株式会社		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
I ☒ 国際予備審査報告の基礎
II ☐ 優先権
III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
IV ☐ 発明の単一性の欠如
V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
VI ☐ ある種の引用文献
VII ☐ 国際出願の不備
VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 24.08.00	国際予備審査報告を作成した日 24.01.01	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 鈴木 恵理子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4N 8114

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-22	有
	請求の範囲		無
進歩性(IS)	請求の範囲	1-22	有
	請求の範囲		無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-22	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲1-22について

国際調査報告で引用した文献1、2(US, 5618665, A (Regents of the University of Minnesota) 31. 5月. 1994 (31. 05. 94)、EP, 781851, A1 (KIKKOMAN CORP) 02. 7月. 1997 (02. 07. 97))には、請求の範囲1の発明の特徴である、非環状アデニンヌクレオチド類及び内因性グルコース-6-リン酸を除去するために、アピラーゼ、アルカリフォスファターゼ、及びアデノシンデアミナーゼの3酵素を併用することは記載も示唆もされていない。一方、請求の範囲1の発明においては、上記3酵素を併用することにより、上記文献1、2から予測できない程の効果が奏せられており、新規性、進歩性を有する。

また、請求の範囲1の発明を技術的に限定化、具体化した請求の範囲2-20の発明、及び請求の範囲1の発明を実施するためのキットに関する請求の範囲21、22の発明も、同様に新規性、進歩性を有する。

PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 661450	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/01494	国際出願日 (日.月.年) 13.03.00	優先日 (日.月.年) 18.03.99
出願人(氏名又は名称) 扶桑薬品工業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12Q1/06, C12Q1/34, C12Q1/42, C12Q1/48

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12Q1/00~1/52

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG)

CA (STN)

MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	US, 5618665, A (Regents of the University of Minne	1-2
Y	sota) 31. 5月. 1994 (31. 05. 94) & WO94/1	4-9, 21
	7198, A	
Y	EP, 781851, A1 (KIKKOMAN CORP) 02. 7月. 199	1
	7 (02. 07. 97) & JP, 9-182600, A&US, 5	
	891702, A	
A	EP, 794260, A1 (KIKKOMAN CORP) 10. 9月. 199	1-22
	7 (10. 09. 97) & JP, 9-234099, A&US, 5	
	891659, A	

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06. 06. 00

国際調査報告の発送日

20.06.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子



4N

8114

電話番号 03-3581-1101 内線 3448